

# WEST Search History

up dated  
4/9/03  
vbf

DATE: Wednesday, April 09, 2003

## Set Name Query

side by side

## Hit Count Set Name

result set

*DB=USPT; PLUR=YES; OP=AND*

L1	frist.clm. same (polyclonal or poly-clonal).clm.	0	L1
L2	first.clm. same (polyclonal or poly-clonal).clm.	82	L2
L3	second.clm. same (polyclonal or poly-clonal).clm.	87	L3
L4	L3 an dl2	0	L4
L5	L3 and l2	58	L5
L6	L5 and (streptoco\$ or pneumoniae or pneumococ\$ or teichoic or lipoteichoic or lipo-teichoic or pnc or c-pn or polysaccharide or meningitis)	13	L6

END OF SEARCH HISTORY

**cerebrospinal fluid.**

Volken R H; Davis D; Winkelstein J; Russell H; Sippel J E  
Journal of clinical microbiology (UNITED STATES) Oct 1984, 20 (4)  
p802-5, ISSN 0095-1137 Journal Code: 7505564  
Contract/Grant No.: N01-AI-22680; AI; NIAID  
Document type: Journal Article  
Languages: ENGLISH  
Main Citation Owner: NLM  
Record type: Completed  
Subfile: INDEX MEDICUS

A solid-phase **immunoassay** utilizing horse **antiserum** against the C **polysaccharide** of **Streptococcus pneumoniae** and biotinylated rabbit antibodies to type-specific pneumococcal polysaccharides was developed to detect pneumococcal antigens in human body fluids and in broth cultures. Pneumococcal antigen could be detected in broth cultures of serotypes of S. pneumoniae containing as little as 10(2) to 10(3) organisms per ml. The **assay** system detected pneumococcal antigen in all 25 cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with documented pneumococcal meningitis. There were no positive reactions noted in specimens from patients infected with Neisseria meningitidis group A or from patients without evidence of bacterial infection. The solid-phase enzyme **immunoassay** utilizing these reagents is a sensitive and specific **assay** for the immunodetection of a wide range of pneumococcal antigens.

Tags: Human; Support, Non-U.S. Gov't; Support, U.S. Gov't, P.H.S.  
Descriptors: Antigens, Bacterial--cerebrospinal fluid--CF; \*  
**Streptococcus pneumoniae--immunology--IM; Adult; Child; Immunoenzyme**  
Techniques; Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM  
CAS Registry No.: 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Polysaccharides,  
Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))  
Record Date Created: 19841206  
Record Date Completed: 19841206

3/9/32

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04610292 84253646 PMID: 6611086

**Evaluation of the Directigen and Phadebact agglutination tests.**

McGraw T P; Bruckner D A  
American journal of clinical pathology (UNITED STATES) Jul 1984, 82  
(1) p97-9, ISSN 0002-9173 Journal Code: 0370470  
Document type: Journal Article  
Languages: ENGLISH  
Main Citation Owner: NLM  
Record type: Completed  
Subfile: AIM; INDEX MEDICUS  
Comparison testing of the Directigen latex agglutination (LA) kit, the Phadebact coagglutination (COA) kit, and counter-immunoelectrophoresis (CIE) demonstrated that the commercial LA reagents were slightly more sensitive than the COA reagents for the detection of pneumococcal polysaccharide types 2, 4, 8, 9, 12, 19, 23, 25, 51, and 56, and meningococcal **polysaccharide** from Group C. The COA reagents were slightly more sensitive than the LA reagents for the detection of pneumococcal polysaccharide type 6A. The sensitivity of LA and COA reagents for the detection of Hemophilus influenzae type b capsular polysaccharide, pneumococcal polysaccharide types 1, 3, 14, and meningococcal Group A were equivalent. **Purified** meningococcal polysaccharides of Groups B, C, and W135 were detected uniformly by CIE but not with the COA reagent. The COA reagent reacted with antigen of Groups B, C, and W135 from broth culture but with less sensitivity than CIE. In general, CIE was the least sensitive **method** for detecting bacterial antigens. In addition, the commercial CIE **antisera** for H. influenzae type b, or meningococcal polysaccharides were susceptible to false-negative results due to antigen excess.

Tags: Comparative Study

Descriptors: \*Agglutination Tests; \*Latex Fixation Tests; \*Reagent Kits, Diagnostic; Antigens, Bacterial--analysis--AN; Counterimmunoelectrophoresis; Haemophilus influenzae--immunology--IM; Latex Fixation Tests--standards--ST; Polysaccharides, Bacterial--analysis--AN; Reagent Kits, Diagnostic

4/03 update card

--standards--ST

CAS Registry No.: 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (Reagent Kits, Diagnostic); 0 (meningococcal group C polysaccharide); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19840727

Record Date Completed: 19840727

3/9/33

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04558554 84201623 PMID: 6202230

**Grouping of haemolytic streptococci by monoclonal antibodies: determinant specificity, cross-reactivity and affinity .**

Herbst H; Lavanchy D; Braun D G

Annales d'immunologie (FRANCE) Nov-Dec 1983, 134D (3) p349-71,  
ISSN 0300-4910 Journal Code: 0353045

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

**Streptococcal** group polysaccharide (CHO), A-, A-variant-, B-, C-, D- and G-specific monoclonal antibodies were prepared by the hybridoma technique employing spleen cells of several inbred mouse strains which are either high or low responders to the group A-CHO. The isotypes of these reagents were restricted to the class mu and IgG subclasses gamma 3 and--in small numbers--gamma 1. Two distinct categories of antibodies were identified for all but group D specificity: those which agglutinate suspended bacteria but do not precipitate **purified** soluble antigen, and those which show both agglutinating and precipitating properties. The group D antibodies described here were only of the latter category. The reactions were inhibitable by haptens in as far as these were known. Cross-reactions were observed in group-A-specific antibodies with E and L polysaccharides. Most G-CHO-specific antibodies cross-reacted with B-CHO. Association constants determined by fluorescence quenching measurements were for binding of complete A and C **polysaccharides** in the range of 10(6) to greater than 10(8) M-1, and for hapten binding by A-, Av- and C-CHO-specific antibodies in the range of 10(3) to 10(4) M-1. These results support a model of steric arrangements of antigenic determinants on A-variant bacteria and solubilized antigen [42] and allow its extension to **streptococcal** groups A, B, C and G. This model explains the observed functional differences by postulating single, terminal determinants which interact with the prevailing non-precipitating antibodies and internal repeating determinants which react with precipitins, respectively. No significant differences were found in the reactivity patterns to these **streptococcal** group antigens between strains of mice in terms of their ability to respond with high or low serum antibody titres to group A-CHO. On the other hand, within high and low responder strains, different kinetics of the optimal timing of fusion after initiation of the secondary immune reaction by boosting was observed. Low responders were most efficiently used for fusion 1.5 days later than high-responder spleen cells. This feature is interpreted to indicate an earlier proliferation of B lymphocytes in high responders, due to either an improved responsiveness to T-lymphocyte help or a reduced reactivity with T suppressor cells in comparison to low-responder B lymphocytes.

Tags: Animal

Descriptors: Antibodies, Monoclonal--immunology--IM; \*Antibody Affinity ; \*Antigens, Bacterial--immunology--IM; \*Epitopes--immunology--IM; \*Serotyping-- **methods** --MT; \* **Streptococcus** --classification--CL; Antibodies, Monoclonal--biosynthesis--BI; Antibody Specificity; Cross Reactions; Dose-Response Relationship, Immunologic; Hybridomas--immunology --IM; Immunoglobulin Allotypes--biosynthesis--BI; Mice; Mice, Inbred A; Mice, Inbred BALB C; Mice, Inbred C57BL; Polysaccharides, Bacterial --immunology--IM; Precipitins--immunology--IM; **Streptococcus** --immunology --IM

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Monoclonal); 0 (Antigens, Bacterial) ; 0 (Epitopes); 0 (Immunoglobulin Allotypes); 0 (Polysaccharides,

Bacterial); 0 (Precipitins); 0 (streptococcal polysaccharide group A)  
Record Date Created: 19840608  
Record Date Completed: 19840608

3/9/34

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04520524 84163389 PMID: 6200538

**Inhibition of plaque-forming cells with anti-idiotope or hapten: variation due to hapten density on indicator red cells.**

Cronkhite R; Cerny J; DeLisi C

Journal of immunological methods (NETHERLANDS) Mar 30 1984, 68 (1-2)  
p109-18, ISSN 0022-1759 Journal Code: 1305440

Contract/Grant No.: AI 17201; AI; NIAID

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Phosphorylcholine (PC)-specific antibody plaque-forming cells (PFC) were enumerated in the spleen of BALB/c mice immunized with *S. pneumoniae* R36a bacterial vaccine. Two indicator red blood cells were compared: RBC coupled with the hapten, PC-RBC, and cells coupled with PC-bearing polysaccharide from the pneumococcus, PnC-RBC. Equal numbers of direct (IgM) PFC were detected with both types of indicator cells. However, a significant difference appeared in the attempt to inhibit the respective PFC either with hapten (monovalent PC chloride, PCCL) or with monoclonal antibodies against T15 idiotopes (anti-Id). At optimal coupling concentrations, inhibition of anti-PnC-RBC plaques required a 10-fold higher concentration of the hapten when compared to anti-PC-SRBC plaques. Also, the inhibition of anti-PnC-SRBC plaques with anti-Id required much higher concentration of the antibody. The phenomenon may be explained by a higher epitope density on PnC-RBC than on PC-RBC. Heavily coupled PC-RBC were more difficult to inhibit (much like the PnC-RBC) by either the hapten or the anti-Id than lightly coupled PC-RBC. A mathematical analysis of the experimental curves supports the notion that under the **assay** conditions used, inhibition by either the hapten or the anti-Id is influenced primarily by antibody secretion rate and epitope density on indicator cells. If the 2 variables are too high, a significant inhibition of PFC with a low **affinity** anti-Id may not be possible. The theory also predicted that addition of a small amount of hapten into the **assay** would be roughly equivalent to secretion rate reduction and would facilitate the plaque inhibition by anti-Id. Indeed, we show a synergism between a minute (non-inhibitory) amount of PCCL and anti-Id in the inhibition of PC-specific PFC. These results point out that the detection of an idiotype-bearing PFC by plaque-inhibition **assay** is greatly influenced by technical variation in the **assay**, in particular, the preparation of the indicator red cells.

Tags: Animal; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: \*Antibody-Producing Cells--immunology--IM; \*Haptens--immunology--IM; \*Hemolytic Plaque Technique; \*Immunoglobulin Idiotypes--immunology--IM; Diazonium Compounds--diagnostic use--DU; Epitopes--immunology--IM; Erythrocytes; Indicators and Reagents; Mice; Mice, Inbred BALB C; Phosphorus--diagnostic use--DU; Phosphorylcholine--immunology--IM; Polysaccharides, Bacterial--pharmacology--PD; Sheep

CAS Registry No.: 0 (Diazonium Compounds); 0 (Epitopes); 0 (Haptens); 0 (Immunoglobulin Idiotypes); 0 (Indicators and Reagents); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus)); 10025-87-3 (phosphoryl chloride); 107-73-3 (Phosphorylcholine); 7723-14-0 (Phosphorus)

Record Date Created: 19840516

Record Date Completed: 19840516

3/9/35

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04446699 84089066 PMID: 6361145

**A new sensitive assay for the calcium-dependent binding of C-reactive protein to phosphorylcholine.**

Tanaka T; Robey F A

Journal of immunological methods (NETHERLANDS) Dec 30 1983, 65 (3)  
p333-41, ISSN 0022-1759 Journal Code: 1305440

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

A new sensitive **assay** for the calcium-dependent binding of rabbit C-reactive protein to phosphorylcholine has been developed. The **assay** involves coating the wells of polyvinylchloride microtiter plates with a bovine serum albumin-phosphorylcholine conjugate followed by the addition of C-reactive protein. The quantity of C-reactive protein is determined by indirect enzyme-linked immunoadsorbent **assay** using first, **affinity purified** goat anti-C-reactive protein immunoglobulin followed by a commercial rabbit anti-goat immunoglobulin-alkaline phosphatase conjugate. The binding of rabbit C-reactive protein to the bovine serum albumin-phosphorylcholine conjugate is completely inhibited by free phosphorylcholine, by pneumococcal C - **polysaccharide** and by calcium chelators but not by high concentrations of neutral, cationic or zwitterionic detergents. The **assay** is sensitive to 2 ng C-reactive protein.

Tags: Animal

Descriptors: \*C-Reactive Protein--metabolism--ME; \*Calcium--metabolism--ME; \*Choline--analogs and derivatives--AA; \*Immunosorbent Techniques; \*Phosphorylcholine--metabolism--ME; Binding, Competitive; Chelating Agents--pharmacology--PD; Detergents--pharmacology--PD; Dose-Response Relationship, Drug; Phosphorylcholine--pharmacology--PD; Polysaccharides, Bacterial--pharmacology--PD; Protein Binding--drug effects--DE; Pyridoxal Phosphate--pharmacology--PD; Rabbits; Serum Albumin, Bovine--metabolism--ME

CAS Registry No.: 0 (Chelating Agents); 0 (Detergents); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (Serum Albumin, Bovine); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus)); 107-73-3 (Phosphorylcholine); 54-47-7 (Pyridoxal Phosphate); 62-49-7 (Choline); 7440-70-2 (Calcium); 9007-41-4 (C-Reactive Protein)

Record Date Created: 19840222

Record Date Completed: 19840222

3/9/36

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04130208 83260101 PMID: 6872361

**Serologic cross-reactions among streptococcal group A, A-variant, and C polysaccharides .**

Shulman S T; Ayoub E M

Clinical immunology and immunopathology (UNITED STATES) Aug 1983, 28  
(2) p229-42, ISSN 0090-1229 Journal Code: 0356637

Contract/Grant No.: AI 09645; AI; NIAID; HL20533; HL; NHLBI

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Serologic cross-reactions among **streptococcal** groups A, A-variant (A-V), and C cell wall **polysaccharides** were found previously in studies employing capillary or quantitative precipitin techniques. Similar cross-reactions occur with radioimmune precipitation using extrinsically labeled 125I- **streptococcal** antigens. This study was performed to determine the degree of cross-reactivity when intrinsically labeled 14C-polysaccharide antigens were used in the radioimmune precipitin **assay** . Unadsorbed **antisera** from rabbits immunized with group A **streptococci** bound 3-5% as much 14C-A-V antigen as homologous A carbohydrate but undetectable amounts of C **polysaccharide** . Similarly, A-V **antisera** bound 3-5% as much 14C-A or 14C-C carbohydrate as A-V antigen. Group C

**antiserum** bound 1-2% as much A and A-V antigens as C carbohydrate. Thus, less than 3% of intrinsically labelled 14C-A or 14C-C carbohydrate represents exposed A-V antigenic sites, i.e., exposed polyrhamnose backbone. Otherwise, group A, C, or A-V carbohydrates failed to exhibit heterologous determinants. Anti-peptidoglycan antibodies in **antisera** did not result in serologic cross-reactivity. These data suggest that formamide-extracted **streptococcal** group-specific polysaccharides, intrinsically labeled with 14C, may possess greater group specificity than 125I-carbohydrates and yield only negligible cross-reactivity with heterologous **antisera**. This degree of cross-reactivity does not appear to be sufficient to account for the persistently elevated serum levels of antibody to group A carbohydrate in patients with rheumatic heart disease.

Tags: Animal; Support, Non-U.S. Gov't; Support, U.S. Gov't, P.H.S. \

Descriptors: \*Antibodies, Bacterial--physiology--PH; \*Antigens, Bacterial--immunology--IM; \*Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; Acetylgalactosamine--pharmacology--PD; Acetylglucosamine--pharmacology--PD; Acetylglucosaminidase--pharmacology--PD; Binding, Competitive; Cross Reactions; Immune Sera--genetics--GE; Immune Sera--pharmacology--PD; Peptidoglycan--pharmacology--PD; Polysaccharides, Bacterial--genetics--GE; Polysaccharides, Bacterial--metabolism--ME; Rabbits; Rhamnose--pharmacology--PD; Variation (Genetics)

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Immune Sera); 0 (Peptidoglycan); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus)); 0 (streptococcal polysaccharide group A); 10485-94-6 (Rhamnose); 31022-50-1 (Acetylgalactosamine); 7512-17-6 (Acetylglucosamine)

Enzyme No.: EC 3.2.1.30 (Acetylglucosaminidase)

Record Date Created: 19830920

Record Date Completed: 19830920

3/9/37

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04130068 83259961 PMID: 6872327

**The detection and specificity of class specific antibodies to whole bacterial cells using a solid phase radioimmunoassay.**

Czerkinsky C; Rees A S; Bergmeier L A; Challacombe S J

Clinical and experimental immunology (ENGLAND) Jul 1983, 53 (1) p192-200, ISSN 0009-9104 Journal Code: 0057202

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

A solid phase radioimmunoassay has been developed which can be used for the detection of isotype specific antibodies to whole bacteria and other particulate antigens, and is applicable to a variety of species. Bacteria are bound to the solid phase by the use either of antibodies, or of methyl glyoxal. Both **methods** result in a sensitive and reproducible **assay**, and bacteria do not appear to desorb from the solid phase. The specificity of antibodies to whole bacteria was examined by absorption of **antisera** with various species of bacteria and retesting, or by determining the binding of **antisera** to various bacteria bound to the solid phase. Both **methods** revealed specificity for the bacteria examined. Inhibition studies showed that antibodies to **Streptococcus** mutans whole cells could be inhibited by **purified** cell surface antigens glucosyltransferase and antigen I/II, but only minimally by lipoteichoic acid, **c polysaccharide** or dextran. In murine **antisera** antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes could be detected at amounts of less than 1 ng/ml.

Tags: Animal; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: \*Antibodies, Bacterial--analysis--AN; \*Antibody Specificity; Actinomyces--immunology--IM; Antigens, Bacterial--immunology--IM; Mice; Radioimmunoassay--**methods**--MT; **Streptococcus**--immunology--IM; Temperature; Time Factors; Veillonella--immunology--IM

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antigens, Bacterial)

Record Date Created: 19830923

Record Date Completed: 19830923

3/9/38

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04055457 83184687 PMID: 6188698

**Characterization of serological cross-reactivity between polysaccharide antigens of Streptococcus mutans serotypes c and d.**

Grossi S; Prakobphol A; Linzer R; Campbell L K; Knox K W

Infection and immunity (UNITED STATES) Mar 1983, 39 (3) p1473-6,

ISSN 0019-9567 Journal Code: 0246127

Contract/Grant No.: DEO4174; DE; NIDCR; DEO5017; DE; NIDCR

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Immunological assays with antisera prepared against purified Streptococcus mutans serotype c polysaccharide demonstrated that a cross-reacting determinant on c polysaccharide reacted with the wall-associated rhamnose-glucose polysaccharide from S. mutans serotype d. Studies with 60 antisera prepared against chemostat cultures of S. mutans Ingbritt (c) demonstrated that the rhamnose-glucose polysaccharide cross-reactive determinant was consistently expressed on c antigen under a variety of growth conditions.

Tags: Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; \* Streptococcus mutans--immunology--IM; Cell Wall--immunology--IM; Cross Reactions; Epitopes--immunology--IM; Glucose; Hydrogen-Ion Concentration; Rhamnose; Serotyping; Streptococcus mutans--classification--CL; Streptococcus mutans--growth and development--GD

CAS Registry No.: 0 (Epitopes); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 10485-94-6 (Rhamnose); 50-99-7 (Glucose)

Record Date Created: 19830623

Record Date Completed: 19830623

3/9/39

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

03643596 82054247 PMID: 7028874

**Binding of C-reactive protein to human lymphocytes. I. Requirement for a binding specificity.**

James K; Hansen B; Gewurz H

Journal of immunology (Baltimore, Md. - 1950) (UNITED STATES) Dec 1981, 127 (6) p2539-44, ISSN 0022-1767 Journal Code: 2985117R

Contract/Grant No.: AI-12870; AI; NIAID

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: AIM; INDEX MEDICUS

Our laboratory previously reported that C-reactive protein (CRP) binds selectively to T lymphocytes and inhibits certain of their reactivities in vitro. However, these findings could not be repeated using more highly purified CRP preparations even under a variety of experimental conditions. Purified CRP alone did not bind to peripheral blood lymphocytes (PBL); however, in the presence of a ligand such as pneumococcal C - polysaccharide (CPS), CRP binding was readily detectable both by immunofluorescence and by a radioassay established for this purpose. The optimal concentration of CRP, ratio of CRP:CPS, and time and temperature for reactivity were determined using both assays. A markedly enhanced rate of binding was observed after pre-equilibration of CRP with calcium. A small percentage (mean 3.0%; range 0.5 to 8.0%) of PBL bound complexed CRP, and saturation was reached with 200 microgram CRP/ml. Reactivity of CRP with a multimeric form of phosphocholine (PC) (KLH-PC44) led to binding comparable to that observed with CPS, whereas monomeric PC

inhibited the binding. Thus, in the presence of a multimeric binding specificity, CRP binds to a small fraction of peripheral blood lymphocytes, which are characterized in the accompanying paper.

Tags: Human; Support, Non-U.S. Gov't; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: \*C-Reactive Protein--metabolism--ME; \*Lymphocytes  
--metabolism--ME; Binding Sites; Fluorescent Antibody Technique;  
Polysaccharides, Bacterial--metabolism--ME; **Streptococcus** pneumoniae;  
T-Lymphocytes--metabolism--ME; Temperature; Time Factors

CAS Registry No.: 0 (Polysaccharides, Bacterial); 9007-41-4  
(C-Reactive Protein)

Record Date Created: 19820128

Record Date Completed: 19820128

3/9/40

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

02772620 78202244 PMID: 351636

**Immunochemistry of streptococcal group C polysaccharide and the nature of its crossreaction with the Forssman glycolipid.**

Coligan J E; Fraser B A; Kindt T J

Progress in clinical and biological research (UNITED STATES) 1978, 23  
p601-12, ISSN 0361-7742 Journal Code: 7605701

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Acid hydrolysis of **streptococcal Group C polysaccharide** yields a disaccharide, 3-O-alpha-N-acetylgalactosaminosyl-N-acetylgalactosamine (3-O-alpha-GalNAc-GalNAc) which expresses Group C antigenic activity. This disaccharide, which exists as a side chain in the intact polysaccharide, can completely inhibit the binding between Group C **polysaccharide** and most Group C antibodies, indicating that this unit is the immunodominant feature of the intact polysaccharide. The alpha anomeric configuration and N-acetylation are required for the expression of the antigenic activity by the haptenic disaccharide. Also obtained from the acid hydrolysis of the Group C **polysaccharide** are rhamnose oligosaccharides with structural identity to the Group A-variant polysaccharide and with Group A-variant antigenic activity. It is inferred from these data that the Group A-variant polysaccharide structure is the core unit of the Group C **polysaccharide**. The nature of the immunologic crossreactivity between the Forssman glycolipid and Group C **polysaccharide**, which possess identical nonreducing terminal digalactosamine units, was investigated. Rabbit anti-Group C antibodies bound the Forssman glycolipid with approximately the same **affinity** as 3-O-alpha-GalNAc-GalNAc and were capable of mediating lysis of sheep red blood cells (SRBC). Antibody fractions isolated from anti-sheep hemolysin were likewise able to bind Group C **polysaccharide**. The heterologous reactions were in most **assay** systems weaker than reactions with the immunizing antigen.

Tags: Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: Forssman Antigen; \*Polysaccharides, Bacterial; \*  
**Streptococcus** --immunology--IM; Amino Sugars--pharmacology--PD; Cross  
Reactions; Disaccharides--immunology--IM; Hemagglutination Tests;  
**Streptococcus** pyogenes--immunology--IM

CAS Registry No.: 0 (Amino Sugars); 0 (Disaccharides); 0  
(Polysaccharides, Bacterial); 9013-60-9 (Forssman Antigen)

Record Date Created: 19780828

Record Date Completed: 19780828

?logoff hold

09apr03 10:55:24 User228206 Session D1948.2

\$5.73 1.792 DialUnits File155

\$8.40 40 Type(s) in Format 9

\$8.40 40 Types

\$14.13 Estimated cost File155

\$0.92 TELNET

\$15.05 Estimated cost this search

\$15.05 Estimated total session cost 1.954 DialUnits



### Status: Signed Off. (4 minutes)

# WEST Search History

DATE: Wednesday, April 09, 2003

<u>Set</u> <u>Name</u> side by side	<u>Query</u>	<u>Hit</u> <u>Count</u>	<u>Set</u> <u>Name</u> result set
<i>DB=USPT; PLUR=YES; OP=AND</i>			
L1	acetamido near amino near6 trideoxygalactose	0	L1
L2	acetamido near3 amino near6 trideoxygalactose	0	L2
L3	acetamido-amino-trideoxygalactose	0	L3
L4	acetamidoamino-trideoxygalactose	0	L4
L5	\$trideoxygalactose	0	L5
L6	tri-deoxy-galactose	0	L6
L7	trideoxy-galactose	0	L7
L8	tri-deoxygalactose	0	L8
L9	deoxygalactose	79	L9
L10	L9.clm.	9	L10
L11	L9 and strep\$	25	L11
L12	(c-pn or pn-c or pnc or c-polysaccharide or polysaccharide-c).clm.	4	L12
L13	phosphorylcholine or phosphoryl-choline or phos-phoryl-choline or phos-phorylcholine	604	L13
L14	L13.ti,ab,clm.	77	L14
L15	L14 and strepto\$	8	L15
L16	L13 and streptoc\$ not l14	55	L16
L17	L13 and streptoc\$	61	L17
L18	L13 same streptoc\$	14	L18
L19	('6495139')[PN]	1	L19

END OF SEARCH HISTORY

.

.

# WEST Search History

DATE: Wednesday, April 09, 2003

<u>Set Name</u>	<u>Query</u>	<u>Hit</u> <u>Count</u>	<u>Set</u> <u>Name</u> result set
side by side			
<i>DB=USPT,PGPB,JPAB,EPAB,DWPI,TDBD; PLUR=YES; OP=AND</i>			
L1	teichoic\$.clm. or \$teichoic.clm.	34	L1
L2	L1 and (pneumoco\$ or streptoc\$ or pneumoniae).clm.	7	L2

END OF SEARCH HISTORY

**WEST**

Generate Collection

Print

L6: Entry 4 of 13

File: USPT

Feb 27, 2001

DOCUMENT-IDENTIFIER: US 6194221 B1

TITLE: Hybrid one-step immunochromatographic device and method of use

Parent Case Text (2):

This application is a continuation-in-part to Cunningham, Huang, Rehg, Fan and Willrodt, ONE-STEP IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DEVICE AND METHOD OF USE, Ser. No. 08/752,695, filed on Nov. 19, 1996 now abandoned and a continuation-in-part to Cheng, Wu, Cunningham, Huang, Fan and Willrodt, METHODS OF USE OF ONE STEP IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DEVICE FOR STREPTOCOCCUS A ANTIGEN, application Ser. No. 08/900,559, filed on Jul. 25, 1997, now pending incorporated herein by reference including drawings.

Brief Summary Text (46):

Taking advantage of the test device of the present method, the device can be utilized with a method for detection of analytes directly from a biological sample, such as urine, blood, sputum, or material extracted from swabs or feces. In particular, the invention can be used to detect the presence or absence of human chorionic gonadotropin ("hCG") in urine. This detection is useful, in determining a positive or negative pregnancy in women. Alternatively, the invention can be used to detect the presence or absence of an antigen from streptococcus, for example, streptococcus pyogenes Group A, in material extracted from swabs of throat tissue.

Brief Summary Text (57):

The term "analyte" as used herein refers to a compound or composition to be detected or measured in the test sample. The analyte will have at least one epitope that an antibody or an immunological reactive fragment thereof can recognize. Analyte can include any antigenic substances, haptens, antibodies and combinations thereof. The analyte of interest in an assay can be, for example, a protein, a peptide, an amino acid, a nucleic acid, a hormone, a steroid, a vitamin, a pathogenic microorganism for which polyclonal and/or monoclonal antibodies can be produced, a natural or synthetic chemical substance, a contaminant, a drug including those administered for therapeutic purposes as well as those administered for illicit purposes, and metabolites of or antibodies to any of the above substances. One preferred example of a hormone suitable for detection is human chorionic gonadotropin ("hCG"). Additional examples of preferred analytes are the pathogenic organisms streptococcus group A or B, or *H. pylori*. Other examples of preferred analytes are human antibodies against infectious agents such as HIV (used in diagnosis of AIDS), EBV (used in diagnosis of mononucleosis), or hepatitis virus, etc. Still other examples of preferred analytes are human proteins such as myoglobin, creatine kinase-MB, troponin-I, troponin-T or hemoglobin, etc.

Brief Summary Text (67):

Indicator labeling reagents may be, for example, a monoclonal or polyclonal antibody to the .beta.-epitope of hCG, or a polyclonal or monoclonal antibody to the carbohydrate antigen of Streptococcus Group A. It is well

known in the art that the carbohydrate antigen of Group A Streptococcus contains a repeated epitope. Thus, a sandwich complex can be formed even if the indicator capture reagent and the indicator labeling reagent each contain an antibody to the same epitope of Strep A.

Detailed Description Text (11):

In an assay using the device shown in FIG. 9, the sample receiving region (4) of the assay device is directly placed into a sample containing extracted analytes, for example, a processed throat swab sample which may contain extracted Streptococcus Group A carbohydrate antigen, or a urine stream which may contain hCG. The sample flows laterally along the porous material region by capillary action and migrates past the separate labeling reagent region (3), and then past the labeling reagents in the analyte detection region (2a). The presence and/or the amount of analyte in the sample may then be determined by the visibility of a signal line (2b) formed by the specific binding of the immobilized indicator capture reagent to the analyte-indicator labeling reagent conjugate complex.

Detailed Description Text (32):

A. Strep A antibody: New Zealand white rabbits were injected with partially purified Group A Streptococcus antigen. The rabbits which produced a high titer of antibody were identified by an enzyme immunoassay method. The sera from these rabbits were pooled and purified through Strep A antigen affinity column.

Detailed Description Text (37):

For example, the indicator labeling reagent may be an anti-Group A streptococcus antibody conjugated with blue latex, while the indicator capture reagent may be an anti-Group A streptococcus capture antibody.

Detailed Description Text (56):

Most preferably the one-step assay device will contain an OSOM.TM. Strep A Test . The OSOM.TM. Strep A Test detects either viable or nonviable Group A Streptococcus organisms directly from a throat swab, providing results within 5 minutes.

Detailed Description Text (58):

The OSOM.TM. Strep A Test can be used for the qualitative detection of Group A Streptococcal antigen from throat swabs or confirmation of presumptive Group A Streptococcal colonies recovered from culture.

Detailed Description Text (62):

Comparison of the Sensitivity of Results of the OSOM.TM. Assay for Streptococcus Group A and Other One-Step Assays

Detailed Description Text (66):

These results indicate Wyntek OSOM.TM. Strep A Test can detect Group A Streptococcus cells when present at a concentration as low as 4.times.10.sup.5 cells per swab, while Quidel's and Binax's tests can only detect Strep A cells when present at a concentration of 8.times.10.sup.5 cells per swab or 4.times.10.sup.6 cells per swab, respectively.

Detailed Description Text (70):

In addition, the OSOM Strep A Test was used to confirm the identification of Group A Streptococcus on blood agar plates. As a culture confirmation test, the OSOM Strep A Test was 100% sensitive (62/62) and 100% specific (39/39).

Detailed Description Paragraph Table (4):

Streptococcus Group B Streptococcus Group C Streptococcus Group F streptococcus Group G Streptococcus pneumoniae Streptococcus sanguis Streptococcus mutans Enterococcus faecalis Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis Corynebacterium diphtheria Serratia marcescens Candida albicans Klebsiella pneumoniae Pseudomonas aeruginosa Bordetella pertussis Neisseria meningitides Neisseria gonorrhoeae Neisseria sicca Neisseria subflava Branhamella catarrhalis Hemophilus influenza

CLAIMS:

10. A method to determine the presence or absence of analyte in a sample, which method comprises applying said sample to the sample receiving region of the device of claim 6 so as to permit said sample to flow through the analyte detection region and into the end flow region, and detecting the presence or absence of analyte in the analyte detection region at the discrete capture reagent situs containing the immobile indicator capture reagent, wherein, in the presence of said analyte, said immobile indicator capture reagent forms a complex comprising the analyte, the first or second mobile indicator labeling reagent, and the immobile indicator capture reagent, and said first labeling reagent is a monoclonal or polyclonal antibody immunoreactive with a .beta.-epitope of hCG conjugated to blue latex, said second mobile labeling reagent is a monoclonal or polyclonal antibody immunoreactive with a .beta.-epitope of hCG conjugated to blue latex, and said mobile control labeling reagent is BSA conjugated to red latex.

13. The method of claim 6 wherein said analyte is streptococcus group A.

14. The method of claim 13 wherein said first indicator labeling reagent is a polyclonal antibody immunoreactive with group A streptococcus conjugated to labeling particle.

15. The method of claim 14 wherein said capture reagent is a polyclonal antibody immunoreactive with group A streptococcus.

3/9/5

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

10712217 97061582 PMID: 8905612

**Interaction of the C - polysaccharide of Streptococcus pneumoniae with the receptor asialo-GM1.**

Sundberg-Kovamees M; Holme T; Sjogren A

Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Microbial pathogenesis (ENGLAND) Oct 1996, 21 (4) p223-34, ISSN 0882-4010 Journal Code: 8606191

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

**C - polysaccharide** (PnC) is the major surface component of pneumococci containing phosphoryl choline residues. In order to investigate the possibility that PnC can bind to glycolipid receptors present on epithelial cells we extracted carbohydrate material from a nonencapsulated strain of pneumococci. The components of the extract were separated by gel permeation chromatography. An **ELISA** was used for detection of fractions binding to the pneumococcal glycolipid receptor asialo GM1. These fractions were pooled and analysed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). The <sup>1</sup>H NMR spectrum showed good agreement with a reference spectrum of pure PnC showing that this substance was the major component. Binding of the **purified** PnC to asialo-GM1 was unaffected by protease K treatment. Immunoblots of the **purified** PnC after separation by SDS-PAGE resulted in a characteristic banding pattern. PnC could be released from pneumococci by heat treatment of whole bacteria in buffer as shown by reaction with a monoclonal antibody specific for the phosphoryl choline determinant. After separation by SDS-PAGE of the components of the heat extract, immunoblots showed the presence of bands characteristic for PnC. Eluates from the characteristic bands in the gel were shown to contain material binding to asialo-GM1. This binding was not reduced upon treatment with protease K. Pneumococci deprived of choline by cultivation in a medium containing ethanolamine as the only amino alcohol source did not bind to asialo-GM1, indicating that the phosphoryl choline residue of PnC is essential for the interaction between PnC and the glycolipid receptor. These data provide evidence that PnC containing an intact phosphoryl choline residue is a ligand responsible for binding of pneumococci to the receptor asialo-GM1.

Tags: Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: G(M1) Ganglioside--metabolism--ME; \*Polysaccharides, Bacterial--metabolism--ME; \*Receptors, Cell Surface--metabolism--ME; \***Streptococcus pneumoniae**; Bacterial Adhesion; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Gangliosides; Immunoenzyme Techniques; Phosphorylcholine --metabolism--ME; **Streptococcus pneumoniae**--pathogenicity--PY; Structure-Activity Relationship

CAS Registry No.: 0 (Gangliosides); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (Receptors, Cell Surface); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus)); 107-73-3 (Phosphorylcholine); 37758-47-7 (G(M1) Ganglioside); 71012-19-6 (asialo GM1 ganglioside)

Record Date Created: 19970305

Record Date Completed: 19970305

3/9/6

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

10429561 96235992 PMID: 8636965

**Protective activity of a murine monoclonal antibody against acute and chronic experimental infection with type IV group B streptococcus.**

Ricci M L; von Hunolstein C; Gomez M J; Parisi L; Tissi L; Orefici G

Laboratory of Bacteriology and Medical Mycology, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy.

Journal of medical microbiology (SCOTLAND) Jun 1996, 44 (6) p475-81, ISSN 0022-2615 Journal Code: 0224131



Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

A murine IgM monoclonal antibody (MAB H11) was developed against the type polysaccharide capsular antigen of group B **streptococcus** (GBS), serotype IV, after intraperitoneal immunisation of BALB/c mice with heat-killed bacteria. MAB H11 reacted in immunodiffusion with the **purified** polysaccharide in both its sialylated and desialylated form, giving a line of identity, and opsonised type IV GBS strains in an in vitro **assay**. When administered at the time of intraperitoneal lethal challenge with homologous GBS, or 4 h earlier, MAB H11 protected 90% of the mice. Protection was still observed when MAB H11 was given 4 h after the challenge. This MAB was strongly effective in preventing septic arthritis induced by type IV GBS.

Tags: Animal; Female; Male; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: Antibodies, Monoclonal--immunology--IM; \* **Streptococcal** Infections--prevention and control--PC; \* **Streptococcus** agalactiae --immunology--IM; Acute Disease; Antibodies, Monoclonal--biosynthesis--BI; Antibodies, Monoclonal--therapeutic use--TU; Arthritis, Infectious --prevention and control--PC; Bacterial Capsules--immunology--IM; Chronic Disease; Hybridomas; Immunodiffusion; Immunoglobulin M--biosynthesis--BI; Immunoglobulin M--immunology--IM; Immunoglobulin M--therapeutic use--TU; Mice; Mice, Inbred BALB C; Phagocytosis; **Polysaccharides**, Bacterial --immunology--IM

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Monoclonal); 0 (Bacterial Capsules); 0 (Immunoglobulin M); 0 (Polysaccharides, Bacterial)

Record Date Created: 19960711

Record Date Completed: 19960711

3/9/7

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

09786395 21592864 PMID: 11734706

**Clinical profile of serologically diagnosed pneumococcal pneumonia.**

Juven T; Mertsola J; Toikka P; Virkki R; Leinonen M; Ruuskanen O

Department of Pediatrics, Turku University Hospital, Turku, Finland.

Pediatric infectious disease journal (United States) Nov 2001, 20 (11) p1028-33, ISSN 0891-3668 Journal Code: 8701858

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

OBJECTIVE: To describe the characteristics of serologically diagnosed pneumococcal pneumonia and compare them with those of respiratory syncytial virus (RSV) pneumonia and bacteremic pneumococcal pneumonia. **METHODS**: IgG antibodies to pneumococcal pneumolysin and C - **polysaccharide** as well as immune complexes containing IgG antibodies to pneumolysin and C - **polysaccharide** were measured from acute and convalescent sera of 254 children with community-acquired pneumonia. Evidence of pneumococcal infection was found in 93 children. Clinical and laboratory data were retrospectively collected from the records of 38 children with sole (all tests for 16 other microbes negative) pneumococcal pneumonia and compared with 26 sole RSV-induced pneumonia from the present series and with the data of our 85 bacteremic pneumococcal pneumonia cases reported earlier. **RESULTS**: Serologically diagnosed sole pneumococcal pneumonia clinically overlapped with RSV pneumonia, but RSV pneumonia was more often associated with tachypnea (45% vs. 17%,  $P < 0.05$ ) and low white blood cell counts (means,  $12.0 \times 10^9/l$  vs.  $20.8 \times 10^9/l$ ;  $P < 0.001$ ) as well as low serum C-reactive protein levels (means, 28 mg/l vs. 137 mg/l;  $P < 0.001$ ). Alveolar infiltrates were found in 15% of chest radiographs of children with RSV pneumonia compared with 76% of those in children with sole pneumococcal pneumonia ( $P < 0.001$ ). Patients with bacteremic pneumonia more often appeared ill (79% vs. 50%,  $P < 0.001$ ) and more often had typical pneumococcal pneumonia with high fever, leukocytosis and lobar infiltrates

in their chest radiographs (70% vs. 34%,  $P < 0.05$ ) than those with serologically diagnosed pneumococcal pneumonia. CONCLUSIONS: Serologically detected pneumococcal pneumonia differs significantly from RSV pneumonia in laboratory and chest radiography findings, but the clinical signs and symptoms overlap considerably. Bacteremic pneumococcal pneumonia is a more severe illness than the serologically diagnosed one.

Tags: Comparative Study; Female; Human; Male; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: \*Bacteremia--diagnosis--DI; \*Pneumonia, Pneumococcal--blood--BL; \*Pneumonia, Pneumococcal--diagnosis--DI; \*Respiratory Syncytial Virus Infections--diagnosis--DI; Adolescent; Antigen-Antibody Complex--blood--BL; Antigen-Antibody Complex--immunology--IM; Bacteremia--blood--BL; Bacteremia--immunology--IM; Blood Sedimentation; C-Reactive Protein--analysis--AN; Child; Child, Preschool; Diagnosis, Differential; Immunoglobulin G--blood--BL; Infant; Leukocyte Count; Lung--microbiology--MI; Lung--radiography--RA; Lung--virology--VI; Pneumonia, Pneumococcal--immunology--IM; Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; Respiratory Syncytial Virus Infections--blood--BL; Respiratory Syncytial Virus Infections--immunology--IM; Respiratory Syncytial Viruses--isolation and purification--IP; Retrospective Studies; Severity of Illness Index; **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; **Streptococcus pneumoniae**--isolation and purification--IP; **Streptolysins**--immunology--IM

CAS Registry No.: 0 (Antigen-Antibody Complex); 0 (Immunoglobulin G); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (Streptolysins); 0 (pneumolysin); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus)); 9007-41-4 (C-Reactive Protein)

Record Date Created: 20011205

Record Date Completed: 20020416

3/9/8

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

09412936 21179886 PMID: 11282210

**Quantitative determination of C - polysaccharide in Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.**

Talaga P; Bellamy L; Moreau M

Aventis Pasteur, Campus Merieux, Biochemistry Research Department, 1541 Avenue Marcel Merieux, 69280 Marcy l'Etoile, France.  
philippe.talaga@aventis.com

Vaccine (England) Apr 6 2001, 19 (20-22) p2987-94, ISSN 0264-410X  
Journal Code: 8406899

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Capsular polysaccharides of **Streptococcus pneumoniae** are used to formulate **polyvalent** pneumococcal vaccines. A sensitive **method**, using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), has been developed to quantify the contamination of pneumococcal capsular polysaccharides (PnPs) with the **C - polysaccharide** (C -Ps). As this polysaccharide is highly immunogenic, and since anti C-Ps antibodies are not protective, the need to monitor and reduce its level is of uppermost importance. The **method** is based on the quantification by HPAEC-PAD of ribitol, which is released by a two-step hydrolysis of the PnPs using aqueous hydrofluoric acid (HF) followed by trifluoroacetic acid hydrolysis (TFA). This simple **method** has been shown to provide both qualitative and quantitative information about the purity of polysaccharide preparations.

Descriptors: Bacterial Capsules--analysis--AN; \* **Streptococcus pneumoniae**--chemistry--CH; Chromatography, Ion Exchange; Electrochemistry; Magnetic Resonance Spectroscopy

CAS Registry No.: 0 (Bacterial Capsules)

Record Date Created: 20010403

Record Date Completed: 20010621

A method for the detection of **Streptococcus pneumoniae** in sputum samples by PCR has been developed. The assay employs oligonucleotide primers specific for a portion of the autolysin gene *lytA* of *S. pneumoniae*. Other closely related **streptococci**, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* do not give a positive result in the assay. The assay was capable of detecting between 10 and 100 CFU of *S. pneumoniae* in distilled water and  $1.4 \times 10^4$  CFU/ml in simulated sputum samples. Sputum samples from 33 patients with acute pneumonia were collected and subjected to culture, PCR, and C - polysaccharide antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A significant isolate of *S. pneumoniae* was isolated from 14 patients, of which 13 were positive by PCR and C - polysaccharide antigen ELISA. No positive results were obtained for the 19 patients in whom other pathogens or upper respiratory tract floras only were isolated. The sensitivity of the autolysin PCR is 92.8%, the specificity is 100%, the predictive value of a positive result is 100%, and the predictive value of a negative result is 95%. This suggests that autolysin PCR is suitable for the detection of *S. pneumoniae* in clinical samples.

Tags: Female; Human; Male

Descriptors: Polymerase Chain Reaction-- methods --MT; \*Sputum --microbiology--MI; \* **Streptococcus pneumoniae**--genetics--GE; \* **Streptococcus pneumoniae**--isolation and purification --IP; Adult; Aged; Aged, 80 and over; Base Sequence; DNA Primers--genetics--GE; DNA, Bacterial --genetics--GE; Evaluation Studies; Genes, Bacterial; Middle Age; Molecular Sequence Data; N-Acetylmuramoyl-L-alanine Amidase--genetics--GE; Pneumonia, Pneumococcal--diagnosis--DI; Pneumonia, Pneumococcal--microbiology--MI; Polymerase Chain Reaction--statistics and numerical data--SN; Sensitivity and Specificity

CAS Registry No.: 0 (DNA Primers); 0 (DNA, Bacterial)

Enzyme No.: EC 3.5.1.28 (N-Acetylmuramoyl-L-alanine Amidase)

Gene Symbol: *lytA*

Record Date Created: 19940902

Record Date Completed: 19940902

3/9/11

DIALOG(R) File 155: MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

07478855 92342404 PMID: 1635750

**Prevention of neonatal group B streptococcal infections: advances in maternal vaccine development.**

Coleman R T; Sherer D M; Maniscalco W M

Department of Obstetrics and Gynecology, Strong Memorial Hospital, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, New York.

Obstetrics and gynecology (UNITED STATES) Aug 1992, 80 (2) p301-9, ISSN 0029-7844 Journal Code: 0401101

Document type: Journal Article; Review; Review, Academic

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: AIM; INDEX MEDICUS

OBJECTIVE: We describe the current state of prevention of neonatal group B **streptococcal** infections and present recent advances toward the development of a maternal vaccine for prevention of this disease. DATA SOURCES: We used a MEDLINE search of the Index Medicus from 1976-1992 for articles regarding group B **streptococcus** classification and immunology. Group B **streptococcus** was also cross-referenced with bacterial antigens, antibodies, and vaccines. Relevant textbooks were reviewed. METHODS OF STUDY SELECTION: Fifty-seven articles were selected as providing important background and new findings pertinent to this topic. DATA EXTRACTION AND SYNTHESIS: The literature supports prophylactic use of intrapartum antibiotics in mothers who are known carriers of group B **streptococcus** but highlights the need for more sensitive rapid screening techniques to identify this high-risk population. The promise of intravenous immunoglobulin for neonatal prophylaxis has not been borne out, although hyperimmune and monoclonal preparations offer renewed hope for prophylaxis and adjuvant therapy. Native bacterial polysaccharides, conjugated oligosaccharides and **polysaccharides**, and C proteins have been

investigated as antigens for candidate vaccines. Antibodies elicited in human and animal studies provide protection against bacterial strains possessing these determinants. The theoretical existence of a "universal antigen" is significant because **polysaccharide** and **C** protein formulations are required to be **polyvalent**. CONCLUSIONS: The development of a vaccine for prevention of neonatal group B **streptococcal** sepsis is an attainable goal. Further study of the immunogenic properties of bacterial-cell-wall polysaccharides and their conjugates, C proteins, and the potential universal antigen is required. (57 Refs.)

Tags: Female; Human; Pregnancy

Descriptors: Bacterial Vaccines--administration and dosage--AD; \* **Streptococcal** Infections--prevention and control--PC; \* **Streptococcus** agalactiae; Immunization; Infant, Newborn; Polysaccharides, Bacterial --immunology--IM; Prenatal Care; **Streptococcus** agalactiae--immunology--IM  
CAS Registry No.: 0 (Bacterial Vaccines); 0 (Polysaccharides, Bacterial)

Record Date Created: 19920824

Record Date Completed: 19920824

3/9/12

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

07461658 92325202 PMID: 1624568

**Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against type 6B pneumococcal capsular polysaccharide and cell wall C polysaccharide in chinchilla serum.**

Koskela M; Harris M; Giebink G S

Department of Medical Microbiology, University of Oulu, Finland.

Journal of clinical microbiology (UNITED STATES) Jun 1992, 30 (6)  
p1485-90, ISSN 0095-1137 Journal Code: 7505564

Contract/Grant No.: 5P50-DC00133; DC; NIDCD

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Conjugation of the capsular polysaccharides of **Streptococcus pneumoniae** to protein carriers has introduced a new generation of pneumococcal vaccines which may be efficacious in preventing pneumococcal otitis media during infancy. The chinchilla model has been used extensively for studying the pathogenesis of pneumococcal otitis media and for testing the efficacy of early pneumococcal capsular polysaccharide (PCP) vaccines, but immunologic studies in the chinchilla have been limited by the lack of antibodies against specific immunoglobulin isotypes. By using **affinity - purified** rabbit immunoglobulin G (IgG) anti-chinchilla IgG, IgM, and IgA, we developed a sensitive enzyme **immunoassay** that is highly specific for IgG, IgM, and IgA antibodies against type 6B PCP (anti-6B) and against **C polysaccharide** in chinchilla serum. Antibody titers increased in serum from five chinchillas immunized with a type 6B outer membrane protein complex vaccine. Increases of anti-6B IgG and IgM antibody titers were more striking than increases of anti-6B IgA or anti- **C polysaccharide** IgG, IgM, or IgA titers were.

Tags: Animal; Support, Non-U.S. Gov't; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: Antibodies, Bacterial--blood--BL; \*Immunoglobulin Isotypes --blood--BL; \*Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; \* **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; Bacterial Capsules--immunology--IM; Cell Wall --immunology--IM; Chinchilla; Immunoenzyme Techniques; Immunoglobulin A --blood--BL; Immunoglobulin G--blood--BL; Immunoglobulin M--blood--BL

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Bacterial Capsules); 0 (Immunoglobulin A); 0 (Immunoglobulin G); 0 (Immunoglobulin Isotypes); 0 (Immunoglobulin M); 0 (Polysaccharides, Bacterial)

Record Date Created: 19920807

Record Date Completed: 19920807

3/9/13

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

06775179 91014642 PMID: 2215183

**Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of Streptococcus pneumoniae revealed by immunochemical methods .**

Sorensen U B; Henrichsen J; Chen H C; Szu S C

Laboratory of Developmental and Molecular Immunity, National Institute of Health and Human Development, NIH, Bethesda, Maryland 20892.

Microbial pathogenesis (ENGLAND) May 1990, 8 (5) p325-34, ISSN 0882-4010 Journal Code: 8606191

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

The attachment of capsular polysaccharide to **Streptococcus pneumoniae** was examined using monoclonal and **polyclonal** antibodies. Among the strains examined, the capsular polysaccharide of types 2, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 14, 19F and 23F was bound to the pneumococci whereas that of a type 3 strain was not. Sequential treatment with 2% SDS at 100 degrees C, pronase, and EDTA did not dissociate the capsular polysaccharide from the pneumococci. Treatment of the cells with mutanolysin, a muramidase that degrades the cell wall peptidoglycan of pneumococci and other **streptococci**, released both the capsular and the cell wall **C - polysaccharide (C-Ps)**. Type 6A capsular polysaccharide released from cell walls by mutanolysin treatment, was fractionated by high performance liquid chromatography and examined by immunoelectrophoresis. It was found to be bound to both the C-Ps and the peptidoglycan. The bond between the capsular polysaccharide and the peptidoglycan has not yet been identified but is probably covalent, as the two components could not be dissociated after boiling in SDS. Based on our studies with type 6A, we propose that capsular **polysaccharide** and **C -Ps** of the pneumococcus are linked to the peptidoglycan at different sites and, thereby, indirectly to each other. Studies in mice showed that the peptidoglycan enhanced the serum antibody response to C-Ps but not to type 6A polysaccharide.

Tags: Support, Non-U.S. Gov't; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: Peptidoglycan--metabolism--ME; \*Polysaccharides, Bacterial--metabolism--ME; \* **Streptococcus pneumoniae**--metabolism--ME; Amino Acids--analysis--AN; Cell Wall--metabolism--ME; Chromatography, High Pressure Liquid; Endopeptidases--metabolism--ME; Immunoelectrophoresis; Polysaccharides, Bacterial--analysis--AN; **Streptococcus pneumoniae**--analysis--AN

CAS Registry No.: 0 (Amino Acids); 0 (Peptidoglycan); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Enzyme No.: EC 3.4.- (Endopeptidases); EC 3.4.99.- (mutanolysin)

Record Date Created: 19901027

Record Date Completed: 19901027

3/9/14

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

06667729 90293503 PMID: 2358684

**Analysis of the optimal conditions for the adsorption of type III pneumococcal polysaccharide to plastic for use in solid-phase ELISA .**

Elkins K L; Stashak P W; Baker P J

Laboratory of Immunogenetics, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, MD 20852.

Journal of immunological methods (NETHERLANDS) Jun 12 1990, 130 (1) p123-31, ISSN 0022-1759 Journal Code: 1305440

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

An economical, sensitive enzyme-linked immunosorbent **assay (ELISA)** **method** for measuring all isotypes of immunoglobulin specific for type III

pneumococcal polysaccharide (SSS-III) is described, using 96-well polystyrene microtiter plates coated directly with antigen. To achieve substantial binding of SSS-III to plastic plates, the polysaccharide had to be dissolved in a buffer (0.1 M Hepes) of pH 4.0 or less. Optimal conditions for adsorption of SSS-III to plates were found to be pH 3.5 and a concentration of 1.0 microgram SSS-III/ml (0.1 microgram/well). Under these conditions, murine anti-SSS-III **polyclonal** or monoclonal antibodies could be detected to a limit of about 5-10 ng/ml. The implications of these findings for **assays** that use mixtures of polysaccharides adsorbed to plastic plates are discussed.

Tags: Animal

Descriptors: Antibodies, Bacterial--analysis--AN; \*Antigens, Bacterial--administration and dosage--AD; \*Enzyme-Linked Immunosorbent **Assay** --**methods** --MT; \*Polysaccharides, Bacterial; \* **Streptococcus pneumoniae** --immunology--IM; Adsorption; Dose-Response Relationship, Immunologic; Hydrogen-Ion Concentration; Immunoglobulin Isotypes--immunology--IM; Mice; Mice, Inbred BALB C ; **Polysaccharides** , Bacterial--immunology--IM; Polystyrenes

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Immunoglobulin Isotypes); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (Polystyrenes); 0 (pneumococcal polysaccharide, type III)

Record Date Created: 19900801

Record Date Completed: 19900801

3/9/15

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

06414067 90038591 PMID: 2809235

**Measurement of antibody responses to pneumolysin--a promising method for the presumptive aetiological diagnosis of pneumococcal pneumonia.**

Jalonen E; Paton J C; Koskela M; Kerttula Y; Leinonen M

National Public Health Institute, Helsinki, Finland.

Journal of infection (ENGLAND) Sep 1989, 19 (2) p127-34, ISSN 0163-4453 Journal Code: 7908424

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

An enzymeimmunoassay ( **EIA** ) for measuring antibodies to pneumococcal pneumolysin has been developed. The **method** was used to study the possible pneumococcal aetiology of pneumonia in 159 mostly elderly patients admitted to hospital because of a positive chest X-ray. The results obtained with the **assay** were compared to those obtained by other diagnostic **methods** , namely blood culture, detection of pneumococcal antigen in urine and demonstration of an antibody response to pneumococcal C - **polysaccharide** and capsular polysaccharides. Antibody response to pneumolysin was found in 32 of 39 (82%) patients with pneumococcal pneumonia aetiologically diagnosed presumptively by other **methods** . In addition, the **EIA** for pneumolysin antibodies was positive in 31 patients without evidence of pneumococcal aetiology by other **methods** . The clinical and laboratory investigations of these patients supported the presumption of bacterial infection. We conclude that the **EIA** we have developed for measuring pneumolysin antibodies is a promising, sensitive **method** for the presumptive aetiological diagnosis of pneumococcal pneumonia. The **assay** is simple to perform because only one antigen is needed and measurement of IgG antibodies alone seems to be enough for aetiological diagnosis.

Tags: Human; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: Antibodies, Bacterial--analysis--AN; \*Pneumonia, Pneumococcal--diagnosis--DI; \* **Streptolysins** --immunology--IM; Adolescent; Adult; Aged; Aged, 80 and over; Blood--microbiology--MI; Immunoglobulin A --analysis--AN; Immunoglobulin M--analysis--AN; Middle Age; Pneumonia, Pneumococcal--immunology--IM; Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; Polysaccharides, Bacterial--urine--UR; Septicemia--diagnosis--DI; **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; **Streptococcus pneumoniae** --isolation and **purification** --IP

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Immunoglobulin A); 0

positive results with alpha- **streptococci** do not seem to constitute a practical problem in this **ELISA** developed for detection of pneumococcal **C - polysaccharide** in samples from patients with pneumonia.

Tags: Human

Descriptors: Antigens, Bacterial--immunology--IM; \*Pneumonia, Pneumococcal--diagnosis--DI; \*Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; \***Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; Antigens, Bacterial--analysis --AN; Cross Reactions; Enzyme-Linked Immunosorbent **Assay** ; Staphylococcus aureus--immunology--IM; **Streptococcus** --immunology--IM

CAS Registry No.: 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19870605

Record Date Completed: 19870605

3/9/22

DIALOG(R)File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05459767 87138420 PMID: 3818989

**Identification of non-capsulate strains of Streptococcus pneumoniae by coagglutination.**

Smart L E; Dougall A J; Girdwood R W

Journal of clinical pathology (ENGLAND) Feb 1987, 40 (2) p243,  
ISSN 0021-9746 Journal Code: 0376601

Document type: Letter

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: AIM; INDEX MEDICUS

Tags: Human

Descriptors: **Streptococcus pneumoniae**--isolation and **purification** --IP ; Agglutination; Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; Serotyping--**methods** --MT

CAS Registry No.: 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19870410

Record Date Completed: 19870410

3/9/23

DIALOG(R)File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05441489 87120086 PMID: 3492757

**Vaccination-induced circulation of human B cells secreting type-specific antibodies against pneumococcal polysaccharides.**

Heilmann C; Henrichsen J; Pedersen F K

Scandinavian journal of immunology (ENGLAND) Jan 1987, 25 (1) p61-7,  
ISSN 0300-9475 Journal Code: 0323767

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Indirect plaque-forming cell **assays** detecting B cells secreting antibodies against capsular pneumococcal polysaccharide (PPS) antigens are described. In healthy adult volunteers the total number of B cells secreting IgM antibodies against the antigens in a **polyvalent** PPS vaccine reached a maximum in the blood 6 days after in vivo immunization (mean: 552/10(6) mononuclear cells), whereas the highest concentration of IgG and IgA antibody-secreting cells (SC) were detected 7 days after immunization (means: 628 and 1691/10(6)). B cells secreting antibodies to PPS type 3 (PPS3), PPS8, PPS18C and **C - polysaccharide** (CPS)--a cell wall antigen common to all pneumococci--constituted 9%, 16%, 6% and 5% (means) of the total number of antibody SC respectively. While the majority of the anti-PPS-SC secreted IgA antibodies, the anti-CPS-SC almost exclusively secreted IgG. Pre-vaccination concentrations of anti-PPS were generally low in contrast to antibodies against CPS, which were present in high

05283168 86284440 PMID: 3736498

**Routine use of counterimmunoelectrophoresis for the detection of pneumococcal antigen in sputum.**

Ericsson C H; Hallander H O; Rosen A; Sjogren A M; Sjogren I

Medical microbiology and immunology (GERMANY, WEST) 1986, 175 (4) p241-9, ISSN 0300-8584 Journal Code: 0314524

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Sputum samples obtained routinely for culture from patients at a thoracic department were also examined for pneumococcal antigen by means of counterimmunoelectrophoresis (CIE), using a **polyvalent** antipneumococcal type serum (omniserum). Pneumococci were found in 1.3% of the 880 cultures, whereas pneumococcal antigen was detected with CIE in 6.5%. The validity of these findings was tested by correlating them with the presence of clinical symptoms in those with positive tests and also by antigen detection in **ELISA** using monoclonal antibodies specific for the **C - polysaccharide** common to all types of pneumococci. Clinical findings corresponding to confirmed or probable current chest infection were found in 36 of the 48 patients with positive CIE. **ELISA** was positive in 33 of the 38 patients with positive CIE who were tested. Although the study deals with an unselected material of chest patients, it indicates that CIE is a sensitive **method** and that it is independent of current antibiotic treatment. Pneumococcal infection is probably of importance in exacerbations of chronic obstructive lung disease, but the clinical usefulness of detecting pneumococcal and other antigens in this patient group needs to be studied further.

Tags: Human

Descriptors: Antigens, Bacterial--analysis--AN; \*Pneumococcal Infections --diagnosis--DI; \*Pneumonia, Pneumococcal--diagnosis--DI; \*Sputum --microbiology--MI; \* **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; Antibodies, Monoclonal--diagnostic use--DU; Counterimmunoelectrophoresis; Enzyme-Linked Immunosorbent **Assay** ; Lung Diseases, Obstructive--diagnosis --DI; Sputum--immunology--IM

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Monoclonal); 0 (Antigens, Bacterial)

Record Date Created: 19860923

Record Date Completed: 19860923

3/9/26

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05275652 86276917 PMID: 3733220

**Detection and specificity of antibodies secreted by spleen cells in mice immunized with Streptococcus mutans.**

Russell M W; Czerkinsky C; Moldoveanu Z

Infection and immunity (UNITED STATES) Aug 1986, 53 (2) p317-23, ISSN 0019-9567 Journal Code: 0246127

Contract/Grant No.: DE-02670; DE; NIDCR; DE-06669; DE; NIDCR; DE-06746; DE; NIDCR

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Immune responses of mice to **Streptococcus mutans** serotype c were analyzed by means of the enzyme-linked immunospot **assay** to determine the predominant specificities of the antibodies developed. In general, the numbers of splenic antibody-secreting cells correlated with serum antibody levels. A low dose (10<sup>8</sup> CFU) of killed whole cells injected twice intraperitoneally induced antibodies mainly against surface protein antigen I/II. A higher dose (10<sup>9</sup> CFU) given two to six times also resulted in a predominance of antigen I/II antibody-secreting cells and, in addition, antibody responses to surface protein antigen III and lipoteichoic acid occurred. Cells producing antibodies to serotype **c polysaccharide** were elicited only on repeated immunization. These results agreed with the



development of antibodies in rabbits repeatedly immunized intravenously with killed whole cells of *S. mutans*, *S. rattus*, and *S. sobrinus*, which induced specific antibodies in accordance with the surface antigens that they express. Mice immunized twice with the same dose of **purified** antigens I/II and III developed greater numbers of antigen I/II splenic antibody-forming cells than antigen III splenic antibody-forming cells and higher serum antibody levels to antigen I/II than to antigen III. Furthermore, a single injection of antigen I/II but not of antigen III was sufficient to induce a strong specific-antibody response. Some evidence was also obtained for weak **polyclonal** stimulation of spleen cells by *S. mutans* cells and by antigen I/II, a result which could be relevant to the induction by *S. mutans* of antibodies reactive with mammalian tissues. It was concluded that for the antigens examined, *S. mutans* elicited the strongest antibody response against antigen I/II, which was also highly immunogenic in **purified** form.

Tags: Animal; Female; Male; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: Antibodies, Bacterial--analysis--AN; \*Antibody-Producing Cells--immunology--IM; \*Spleen--immunology--IM; \* **Streptococcus** mutans --immunology--IM; Antibody Specificity; Antigens, Bacterial--immunology--IM; Enzyme-Linked Immunosorbent **Assay** ; Immunization; Mice; Mice, Inbred BALB C; Rabbits

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antigens, Bacterial)

Record Date Created: 19860917

Record Date Completed: 19860917

3/9/27

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05141517 86142264 PMID: 3512746

**Assay for antibodies to group C and G streptococcal carbohydrate by enzyme-linked immunosorbent assay .**

Ayoub E M; Hawthorne T; Miller J

Journal of laboratory and clinical medicine (UNITED STATES) Mar 1986, 107 (3) p204-9, ISSN 0022-2143 Journal Code: 0375375

Contract/Grant No.: HL-30059; HL; NHLBI

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: AIM; INDEX MEDICUS

An enzyme-linked immunosorbent technique was established for the **assay** of serum antibodies to the group C and G **streptococcal** group-specific carbohydrates. The antigens consisted of formamide-extracted **purified** polysaccharides conjugated to poly-L-lysine. By use of hyperimmune rabbit **antisera** to the **streptococcal** group-specific polysaccharides A, C, and G, a high degree of specificity was encountered for each of the antigens tested. Antibody titers to these antigens were then measured in sera of 100 normal individuals varying in age from newborn to 20 years. The mean titer of these antibodies increased significantly between the ages of 5 and 15 years and leveled off thereafter. **Assay** of antibodies to the group A, C, and G carbohydrates on sera of patients with antecedent group A **streptococcal** infections or rheumatic fever and their matched normal controls revealed significantly elevated titers for the antibody to **streptococcal** group A carbohydrate only in the sera of these patients. These results support the specificity of these tests and suggest their potential usefulness for providing evidence for infection by the various **streptococcal** serogroups in humans.

Tags: Animal; Human; Support, Non-U.S. Gov't; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: Antibodies, Bacterial--analysis--AN; \*Antigens, Bacterial --immunology--IM; \*Carbohydrates--immunology--IM; \* **Streptococcus** --immunology--IM; \* **Streptococcus** pyogenes--immunology--IM; Adolescent; Adult; Antibody Specificity; Carbohydrates--isolation and **purification** --IP; Child; Child, Preschool; Enzyme-Linked Immunosorbent **Assay** ; Infant; Infant, Newborn; Rabbits; Species Specificity

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Carbohydrates)

Record Date Created: 19860328

Record Date Completed: 19860328

3/9/28

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05141158 86141905 PMID: 3005418

**ELISA detection of human IgG subclass antibodies to Streptococcus mutans.**

Challacombe S J; Biggerstaff M; Greenall C; Kemeny D M

Journal of immunological methods (NETHERLANDS) Feb 27 1986, 87 (1)  
p95-102, ISSN 0022-1759 Journal Code: 1305440

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) has been developed to measure IgG subclass antibodies against whole cells of **Streptococcus** mutans and to a **purified streptococcal** antigen (SA I/II). Bacterial cells were bound to the solid phase using methyl glyoxal and mouse monoclonal **antisera** against IgG and each IgG subclass were used to detect antibodies. Natural antibodies to S. mutans were predominantly of the IgG1 and IgG2 subclasses, though IgG3 and IgG4 antibodies were detectable in most subjects, and were the majority response in a few subjects. Antibodies to SA I/II were predominantly of the IgG1 subclass with virtually no activity detectable in the IgG3 and IgG4 subclasses. Inhibition studies suggested some restriction of IgG subclass responses to bacterial antigens since SA I/II and **c polysaccharide** could inhibit binding of all subclasses to whole cells of S. mutans equally, whereas glucosyltransferase, lipoteichoic acid and dextran showed greatest inhibition of the IgG3 and IgG4 subclasses.

Tags: Human

Descriptors: Immunoglobulin G--classification--CL; \* **Streptococcus** mutans--immunology--IM; Antibodies, Bacterial--analysis--AN; Antibody Specificity; Antigens, Bacterial--immunology--IM; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; Methods ; Periodic Acid--metabolism--ME

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antigens, Bacterial);  
0 (Immunoglobulin G); 10450-60-9 (Periodic Acid)

Record Date Created: 19860328

Record Date Completed: 19860328

3/9/29

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04954998 85261882 PMID: 3874879

**Detection of C polysaccharide in Streptococcus pneumoniae in the sputa of pneumonia patients by an enzyme-linked immunosorbent assay .**

Holmberg H; Holme T; Krook A; Olsson T; Sjoberg L; Sjogren A M

Journal of clinical microbiology (UNITED STATES) Jul 1985, 22 (1)  
p111-5, ISSN 0095-1137 Journal Code: 7505564

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

The pneumococcal **C polysaccharide** (PnC) is species specific and believed to be a cell wall component of all pneumococcal types. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) for detection of PnC in sputa has been developed by using a monoclonal antiphosphorylcholine antibody and a **polyclonal** rabbit anti-PnC **antiserum** in the test system. A 1-year study of adult hospitalized patients with community-acquired pneumonia was performed. A total of 147 patients with clinical and radiological evidence for pneumonia were accepted for the study. Of these, 105 patients provided a sputum sample upon admission to the ward. The sputa were cultured semiquantitatively as well as tested for the presence of antigen. Of the

sputum samples from patients with **Streptococcus pneumoniae**, 27 of 33 (accounting for a sensitivity of 82%) were positive in the **ELISA** test. Of the sputum samples from patients with pneumonia of some other known or suspected etiology, 32 of 34 (accounting for a specificity of 94%) were negative. In addition, 7 sputum samples from 31 patients with pneumonia of unknown etiology were positive. The **ELISA** test described here is in our opinion a sensitive and specific test for detecting PnC from *S. pneumoniae* in sputa from patients with untreated pneumonia.

Tags: Comparative Study; Human; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: Antigens, Bacterial--analysis--AN; \*Pneumonia, Pneumococcal--diagnosis--DI; \*Polysaccharides, Bacterial--analysis--AN; \*Sputum--microbiology--MI; \* **Streptococcus pneumoniae**--analysis--AN; Adult; Antibodies, Monoclonal--diagnostic use--DU; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; Gram-Negative Bacteria--isolation and purification --IP; Haemophilus influenzae--isolation and purification --IP; Pneumonia, Pneumococcal--immunology--IM; Species Specificity; Sputum--immunology--IM; Staphylococcus aureus--isolation and purification --IP; **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; **Streptococcus pneumoniae**--isolation and purification --IP

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Monoclonal); 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19850906

Record Date Completed: 19850906

3/9/30

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04812113 85118357 PMID: 6084398

C - polysaccharide in a pneumococcal vaccine.

Sorensen U B; Henrichsen J

Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section C, Immunology (DENMARK) Dec 1984, 92 (6) p351-6, ISSN 0108-0202  
Journal Code: 8206624

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

The 14-valent pneumococcal vaccine, Pneumovax, was found to contain approximately 250 micrograms per ml of the cell-wall antigen, C - polysaccharide (C -Ps), in addition to 100 micrograms per ml of each of the 14 capsular polysaccharides. Rabbit anti-C -Ps antiserum recognized four components of this C-Ps with different antigenic determinants, corresponding to four fragments with different molecular sizes. By lectin affinity chromatography it was demonstrated that some of the C-Ps in the vaccine contained cell-wall residues. The methods used in this study can also be used for the characterization of other polysaccharide preparations.

Tags: Comparative Study

Descriptors: Bacterial Vaccines--analysis--AN; \*Polysaccharides, Bacterial--analysis--AN; \* **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; Antigens, Bacterial--analysis--AN; Epitopes--analysis--AN; Pneumococcal Vaccines

CAS Registry No.: 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Bacterial Vaccines); 0 (Epitopes); 0 (Pneumococcal Vaccines); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19850321

Record Date Completed: 19850321

3/9/31

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

04725047 85030974 PMID: 6386883

Enzyme immunoassay for detection of pneumococcal antigen in

# WEST Search History

DATE: Wednesday, April 09, 2003

<u>Set Name</u>	<u>Query</u>	<u>Hit Count</u>	<u>Set Name</u> result set
side by side			
<i>DB=USPT; PLUR=YES; OP=AND</i>			
L1	(c-polysaccharide or cpolysaccharide or pnc).ti,ab,clm.	6	L1
<i>DB=USPT,PGPB,JPAB,EPAB,DWPI,TDBD; PLUR=YES; OP=AND</i>			
L2	(c-polysaccharide or cpolysaccharide or pnc).ti,ab,clm.	89	L2
L3	L2 not l1	83	L3
L4	l	2553822	L4
L5	l2	89	L5
L6	(c-polysaccharide or cpolysaccharide or pnc) same (strep or streptoco\$ or pneumon\$)	30	L6
L7	L6 not l2	22	L7

END OF SEARCH HISTORY

**WEST**

Generate Collection

L3: Entry 7 of 83

File: JPAB

Jun 15, 1993

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 05148157 A

TITLE: POLYSACCHARIDE ANTIGEN FROM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Abstract Text (1):

PURPOSE: To prepare the subject polydisperse antigen, having a specific number of oligosaccharide recurring units and a specific level of contamination by a Streptococcus pneumoniae group-specific C-polysaccharide based on a type- specific polysaccharide and useful for a vaccine, etc., for preventing infection with the Streptococcus pneumoniae.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-148157

(43)公開日 平成5年(1993)6月15日

(51)IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/00	G	8413-4C		
	D	8413-4C		
39/09	A D Z	8413-4C		
C 1 2 P 19/04	C	7432-4B		
// (C 1 2 P 19/04				

審査請求 有 請求項の数 9 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-53063

(22)出願日 平成4年(1992)1月28日

(31)優先権主張番号 6 4 6 5 7 3

(32)優先日 1991年1月28日

(33)優先権主張国 米国(U S)

(31)優先権主張番号 8 0 7 9 4 1

(32)優先日 1991年12月19日

(33)優先権主張国 米国(U S)

(71)出願人 390023526

メルク エンド カムパニー インコーポ  
レーテッド

MERCK & COMPANY INC  
OPERATED

アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー  
ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ  
ュー 126

(72)発明者 ビーター ジェー、クニスカーン

アメリカ合衆国、19446 ペンシルヴァニ  
ア、ランスデール、バターソン ドライヴ  
841

(74)代理人 弁理士 岡部 正夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肺炎連鎖球菌からの多糖抗原

(57)【要約】

【構成】 1分子あたり平均約1200以下のオリゴ糖  
反復単位を有し、約1.0ないし1.4の範囲の多分散性  
があり、分子量約 $1 \times 10^5$ ないし $1 \times 10^6$ で、肺炎球  
菌グループ特異的なC多糖の混入の程度がタイプ特異的  
な多糖の3.0%以下である肺炎連鎖球菌(*Streptococ  
cus pneumoniae*)の莢膜多糖。

【効果】 この新規なタイプ特異的多糖生成物は、ワク  
チン、とくに、T細胞刺激担体タンパク質と結合した新  
規な多糖から成る共有結合接合体の製造に有用である。  
この新規な多糖を含むワクチンは、肺炎連鎖球菌(*Stre  
ptococcus pneumoniae*)による感染に関連した疾患の予  
防に有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 1分子あたり平均約1200以下のオリゴ糖反復単位を有し、約1.0ないし1.4の範囲の多分散性があり、分子量約 $1 \times 10^5$ ないし $1 \times 10^6$ で、肺炎球菌グループ特異的なC多糖の混入の程度がタイプ特異的な多糖の3.0%以下である肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の莢膜多糖。

【請求項2】 0.7ないし1.1の範囲の抗原性指数を有し、0.6ないし3.0 d l / g の範囲の固有粘度があり、サブタイプ1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19F、19A、20、22F、23F、及び33Fのいずれかから選ばれる肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に由来する請求項1記載の多糖。

【請求項3】 1.0ないし1.4の範囲のサイズ多分散性があり、タイプ特異的な多糖に対するC多糖の混入の程度が3%以下であって：

1) 該多糖が、

a) 約 $3 \times 10^5$ ないし $6 \times 10^5$ の範囲の $M_N$ 、  
b) 約 $0.60 \pm 0.05$ のK d (ピーク)、  
c) 約 $3 \times 10^5$ ないし $7 \times 10^5$ の範囲の $M_W$ 、  
d) pH 7.2、0.1 Mリン酸ナトリウム中で1.0ないし2.0の範囲の固有粘度、及び  
e) 平均して1分子あたり約1000以下の反復単位を有する肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 6B；

2) 該多糖が、

a) 約 $3 \times 10^5$ ないし $8 \times 10^5$ の範囲の $M_N$ 、  
b) 約 $0.60 \pm 0.05$ のK d (ピーク)、  
c) 約 $4 \times 10^5$ ないし $1 \times 10^6$ の範囲の $M_W$ 、  
d) pH 7.2、0.1 Mリン酸ナトリウム中で0.6ないし1.6の固有粘度、及び

e) 平均して1分子あたり約1200以下の反復単位を有する肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 14；

3) 該多糖が、

a) 約 $2 \times 10^5$ ないし $6 \times 10^5$ の範囲の $M_N$ 、  
b) 約 $0.65 \pm 0.05$ のK d (ピーク)、  
c) 約 $2 \times 10^5$ ないし $6 \times 10^5$ の範囲の $M_W$ 、  
d) pH 7.2、0.1 Mリン酸ナトリウム中で1.0ないし2.0の範囲の固有粘度、及び

e) 平均して1分子あたり約1000以下のモノマー反復単位を有する肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 19F；

4) 該多糖が、

a) 約 $2 \times 10^5$ ないし $6 \times 10^5$ の範囲の $M_N$ 、  
b) 約 $0.54 \pm 0.05$ のK d (ピーク)、  
c) 約 $4 \times 10^5$ ないし $8 \times 10^5$ の範囲の $M_W$ 、

d) pH 7.2、0.1 Mリン酸ナトリウム中で1.5ないし3.0の範囲の固有粘度、及び

e) 平均して1分子あたり約1000以下のモノマー反復単位を有する肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 23F；

5) 該多糖が、

a) 約 $2 \times 10^5$ ないし $4 \times 10^5$ の範囲の $M_N$ 、

b) 約 $0.65 \pm 0.05$ のK d (ピーク)、

c) 約 $2 \times 10^5$ ないし $5 \times 10^5$ の範囲の $M_W$ 、

d) pH 7.2、0.1 Mリン酸ナトリウム中で1.0ないし3.0の範囲の固有粘度、及び

e) 平均して1分子あたり約600以下のモノマー反復単位を有する肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 4；

6) 該多糖が、

a) 約 $3 \times 10^5$ ないし $6 \times 10^5$ の範囲の $M_N$ 、

b) 約 $0.65 \pm 0.05$ のK d (ピーク)、

c) 約 $3 \times 10^5$ ないし $7 \times 10^5$ の範囲の $M_W$ 、

d) pH 7.2、0.1 Mリン酸ナトリウム中で1.0ないし2.0の範囲の固有粘度、及び

e) 平均して1分子あたり約800以下のモノマー反復単位を有する肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 9V；又は

7) 該多糖が、

a) 約 $2 \times 10^5$ ないし $6 \times 10^5$ の範囲の $M_N$ 、

b) 約 $0.65 \pm 0.05$ のK d (ピーク)、

c) 約 $2 \times 10^5$ ないし $6 \times 10^5$ の範囲の $M_W$ 、

d) pH 7.2、0.1 Mリン酸ナトリウム中で1.5ないし3.0の範囲の固有粘度、及び

e) 平均して1分子あたり約700以下のモノマー反復単位を有する肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 18C

に由来する請求項2記載の多糖。

【請求項4】 1ないし7つのサブタイプの肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に対するワクチンとして有用であって、不活性担体及び1つ又はそれ以上の接合していない形態の請求項3記載のP n - P s 化合物を含み、任意に、さらに抗ウイルス、抗菌又は免疫調節作用のある免疫原化合物を含む組成物であって、前記の付加的な抗ウイルス、抗菌又は免疫調節作用のある化合物が、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、又はミョウバン、又はFreundsアジュバントかRib i アジュバント、インターロイキンインターフェロンの中から選ばれるか、あるいは、B型肝炎、A型肝炎、非A非B型肝炎、エイズ、ジフテリア、百日咳、破傷風、はしか、おたふくかぜ、風疹、不活化したポリオ、水痘及びインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 6に対する1つ又はそれ以上のワクチンの中から選ばれる組成物。

【請求項5】 1分子あたり約1200以下のオリゴ糖

反復単位を持ち、1.4以下の多分散性を有する肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)の莢膜多糖の製造方法であって:

a) i) 肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)を培養し、病原体生物を殺して、未精製莢膜多糖を単離するか、あるいは、

ii) ATCCから入手できる未精製の肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)莢膜多糖を可溶化し;

b) 酵素的又は化学的処理によって、あるいは、加熱、音波処理によって多糖を部分的に加水分解するか、もしくは、多糖を物理的に剪断し;

c) 工程(b)の生成物を分画化することを含む莢膜多糖の製造方法。

【請求項6】 前記工程(b)と(c)が、

b) i) 前記Pn-Psを部分的に加水分解する前に、任意に、不純物のイオン交換吸着によって未精製Pn-Psを精製し;

ii) 未精製Pn-Psを部分的に加水分解するか、又は機械的に剪断し;そして

c) 大きさと純度に応じて、部分的に加水分解したPn-Psを分画化する請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記工程(b)と(c)が、

b) i) pH約5の溶液で、任意に陰イオン不純物をW hatman DE 52 に吸着し;

ii) 以下のようにして、溶液中のPn-Psを部分的 \*

Pn-Psサブタイプ	目標終点粘度 (センチストローク)	目標終点Kd (ピーク)
Pn4-Ps	1.5 - 1.00	0.65 ± 0.05
Pn6B-Ps	1.3 - 1.00	0.60 ± 0.05
Pn9V-Ps	1.3 - 1.00	0.65 ± 0.05
Pn14-Ps	1.2 - 0.95	0.60 ± 0.05
Pn18C-Ps	1.5 - 1.00	0.65 ± 0.05
Pn19F-Ps	1.3 - 1.00	0.65 ± 0.05
Pn23F-Ps	1.5 - 1.00	0.54 ± 0.05

【請求項9】 請求項5記載の方法で製造したPn-Ps。

【発明の詳細な説明】

【0001】 ストレプトコッカス・ニューモニア(*Streptococcus pneumoniae*) (肺炎球菌(*Pneumococci*), Pn)として分類されている本病原性細菌は本微生物の莢膜多糖類(Pn-Ps)に基づいて84種の抗原型に細別されている。これらの微生物に起因する疾病の状態は肺炎、骨髄炎、中耳炎、菌結症及び慢性気管支炎の急性な悪化、静脈洞炎、関節炎、及び血膜炎を含む。しかし、これらの多数の疾病は84種の既知の分離菌の限られた部分集団によって起こされるのである。それ故、最も流行している病原性分離菌のPn-Psを含む多価ワクチンが、この種類の最も頻繁に報告された病原体を極めて高率で防御することができる。

【0002】 多価ワクチンは成人の肺炎球菌に対する防※50

\*に加水分解して、抗肺炎球菌にタイプ特異的な抗体に結合するPn-Psを未精製Pn-Psの30%を超えないように減少させるように前もって決定した最終粘度にする。すなわち:

1. 50ないし150℃で1ないし48時間加熱し;  
2. 音波処理プローブの出力設定に応じて5秒ないし5分間の音波処理を行なった後、冷却時間をおいてさらに音波処理をするか;又は、

3. Gaulin ホモジナイザー内で圧力2000ないし15000PSIで多糖を物理的に剪断し;そして

c) 以下の方法で、加水分解したPn-Psを分画化して、 $1 \times 10^5$ ないし $1 \times 10^6$ の範囲の分子量を有する分画を抜き出す。すなわち:

i) 所望の範囲の分子量のPn-Psを沈殿させるように前もって決定した濃度のイソプロパノールを用いて、アルコール可溶性の差を利用するか;又は

ii) 分子量 $1 \times 10^4$ ないし $1 \times 10^6$ の範囲の多糖をとりこんで分画化することのできるサイズ排除液体クロマトグラフィーで分画化する請求項6記載の方法。

【請求項8】 加水分解又は剪断の終点を、下に掲げる各サブタイプのPn-Psに対する終点に従って、0.9M塩化ナトリウム中の1mg/ml溶液の粘度法によって、あるいは、多糖のクロマトグラフィーによって決定する、請求項7記載の方法。

※御的免疫応答を高めるのに効果があるので製造されてきている。例えば“ニューモバックス(PNEUMOVAX)(登録商標)23”(肺炎球菌多価ワクチン、エム・エス・ディ(MSD);ピー・ディ・アール(PDR)、1990年版、1431頁参照)はその全ての菌がATCCに寄託され、この発明のための出発物質の一つの可能な供給源を提供している23種の肺炎球菌の異なる、非接合多糖類を各50μg/ml含む液体組成物である。

“ニューモバックス(商標)23”は下記の独立し、非接合多糖類の各々を含む:1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19F、19A、20、22F、23F、及び33Fであり、肺炎球菌の分離菌の約90%に相当する。しかし、これらのワクチンは肺炎球菌の感染に最も罹りやすい一部の人々: B-細胞免疫無防備状態の人、年配者および免疫防御をT-細胞応



答に依存している2才以下の幼児にしか効果がない。非接合多糖類はT-細胞免疫応答の不十分な誘導物質であるからPn-PsをT-細胞免疫応答を誘導できる免疫源に変換することがこの攻撃目標である人々に十分な防御を作成する鍵である。しかし、使用はこの個々の多糖類集団又は接合形多糖類に限定されない。例えば、妊娠前又は妊娠中に1種以上の新規な接合物又は非接合Pn-Psを含むワクチンを雌の哺乳動物に投与すると、そのワクチンが直接胎児又は乳児に投与されたのではなくても発育期の胎児及び哺乳期の乳児を受動的に防御することができる抗体が母体に発生する。更に、これらの新規な非接合多糖類の混合物を含む組成物はこの発明の新規なPn-Ps製造物の純度が向上したので入手可能な組成物以上に性質を改良してきた。そして新規な非接合ワクチンの調剤で有用性を証明すべきである。

【0003】先に列挙したストレプトコッカス・ニューモニアの荚膜多糖類の特に好ましい部分集合は、この肺炎球菌亜類型の小集団が乳児及び幼児の肺炎球菌感染の75-85%の原因であると評価されているので、亜類型6B、23F、19F、14、18C、4、及び9Vに由来するものである。しかし、ここに示した方法は肺炎球菌及びその他の細菌の多糖類の広い収集に適用できる。

【0004】本発明の新規なPn-Ps製造物は接合免疫抗原の調製に有用である。多糖類は一般的にそれら自身の免疫性の低いことが見出だされているが、一旦免疫原性蛋白質(PRO)に接合したものは極めて良好な免疫抗原であることが示されている〔マールブルグ(Marburg)等、アメリカ合衆国特許No. 4,695,624; 4,830,852; 4,882,317シュニールソン(Schneerson)等、ニュー・ディベロップメント・ウイズ・ヒューマン・アンド・ヴェテリナリー・ワクチンズ(New Dev. with Hum & Vet. Vaccines)、77-94頁(1980年);シュニールソン等、ジャーナル・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exptl. Med.)、152巻、361頁(1980年);アンダーソン(Anderson)、インフェクション・アンド・イミュニティ(Infection and Immunity)、39巻、233頁(1983年)〕。しかし、このような接合体の製造における重要な問題は多糖類出発物質の非均一性とそのため生じる接合製造物の化学的に明確化することの困難さである。それ故、製造方法には出発物質が可能な限り明確化されていること及び合成経路の各段階が製造中間物として検査可能なことが必要である。ここに開示する方法は接合に反応する化学的に高度に明確化したPn-Ps多糖類抗原を供給することによりこの必要性を充たしている。それ故、Pn-Psの由来と同起源の病原性に対して2才以下の乳児を免疫にするのに有用な接合体の製造は本発明のPn-Ps製造物の新規な特徴によって容易にされる。

【0005】マールブルグ等、(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ(J. Am. Chem. Soc.))、108巻、5282頁(1986年)、及びアメリカ合衆国特許No. 4,695,624; 4,830,852; 4,882,317)は二属スペーサーを通して多糖類と免疫原性蛋白質を接合させる一つの手段を開示した。本PROは付属の求核及び求電子基を示すように誘導され(PRO\*)、これと一対のPsは反対の反応性を持つ付属基を示すように機能化された(Ps\*)。Ps\*をPRO\*と結合させることによりPsをPROに共有結合させる(Ps-PRO)二属スペーサーが形成された。酸加水分解により本二属スペーサーはアミノ酸分析により定量される異常なアミノ酸として放出され、それにより共有結合を証明する手段を提供する。

【0006】本発明はアメリカ合衆国特許No. 4,695,624; 4,830,852及び4,882,317で開示されたもの以上に改良したものである。改良点は粗製のPn-Ps調製物により供給されるものよりは特異的で、再現性があり、取扱いが容易な物性を持ち、増加された溶解性、増加された滲透性、増加された純度(集団特異性C-多糖類(C-PS)による汚染の減少)及び減少された分子量、多分散性及び粘性を含むPn-Ps出発物質の調製を含んでいる。新規Pn-Psの接合は最終製品の調製の一貫性と容易さの増加、改良された抗原性、及び改良された純度の点で特許No. 4,695,624の方法によって示されたもの以上に改良されている。特に従来技術の粗製Pn-Ps調製物に比較して、本発明のPn-Psにおいては集団特異性C-多糖類(CPs)及びペプチドグリカンの汚染が3-20倍も減少していることが重要である。C-多糖類汚染物質の存在は型特異性抗原に対して免疫応答を干渉するものではないが、抗C-多糖類抗体の生産が或る種の未解決な肺炎球菌感染に見られる組織破壊と関連するかもしれない。

【0007】本発明の目的である多糖類もアメリカ合衆国特許No. 4,695,624; 4,830,852; 4,882,317に開示されている以外の方法で共有接合ワクチンを調製する実用性をもっていることが技術分野で理解されることは明白である。

【0008】新規な肺炎球菌多糖類(Pn-Ps)化合物は約 $1 \times 10^5$ から $1 \times 10^6$ の分子量で多分散性が1.0から1.4でありC-多糖類汚染レベルが型特異性多糖類の3%以下で、肺炎球菌型特異性抗体結合は粗製多糖類の型特異性調製物に比較してPn-Ps単位量当たり約70%から110%を有している。

【0009】化学的に高度に明確化されたPn-Ps製造物はPn-Psの粗製調製物をPn-Psの抗原完全性を維持するために前もって測定した終末点まで部分的に加水分解することにより調製する。部分的に加水分解したPn-Psをつぎに精製し多分散性を低下させる。

新規なPn-Psは精製したPn-Psの多価結合混合物及びPn-Ps-免疫原性蛋白質(PRO)接合体(Pn-Ps-PRO)の調製に有用である。新規のPn-Ps化合物はPn-Ps由来の肺炎球菌亜類型による感染に対して防御する免疫応答を顕在化させる。

【0010】一般的肺炎球菌分離物から得られた部分的に加水分解し、高度に精製したPn-Ps中間物は哺乳類における肺炎球菌感染の防御に有用である。このT-細胞依存接合体は哺乳類、特にB-細胞免疫無防備状態の人、年配者、及び2才以下のヒト乳児の抗肺炎球菌免疫応答を刺激するワクチン組成物で特に有用である。ナイセリア・メニンギチディズb(*Neisseria meningitidis* b)からの外膜蛋白質複合物(OMPC)に結合した本発明の新規なPn-Psを含む接合体は次の段階を含む方法により製造される:即ち、ストレプトコッカス・ニューモニア(肺炎球菌、Pn)の培養物から莢膜Pn-Psを分離し、熱、音波による破壊、化学物質又は酵素による処理、又は物理的に本Pn-Psを剪断することにより部分的に加水分解し、Pn-Psを分画して、本Pn-PsをOMPC又はその他の担体蛋白質又は蛋白質複合物に共有的に接合させる。

【0011】本発明の目的は、Pn-Ps及び免疫原性蛋白質のT-細胞依存接合体の調製における中間物として有用な新規な部分的に加水分解され高度に精製された抗原性的に型特異性の肺炎球菌莢膜多糖類(Pn-Ps)を提供することである。もう一つの目的は本発明の新規なPn-Ps化合物を製造する方法を提供することである。もう一つの目的は本新規なPn-Ps化合物を使用する方法を提供することである。これらの方法は次のものを含む:抗肺炎球菌免疫応答の誘発に有用な免疫原性接合体又は遊離多糖類組成物への組み込み;肺炎球菌感染に対して受動的に乳児及び胎児を防御する母体免疫応答の誘発。

#### 【0012】A. 新規なPn-Ps多糖類

新規な、部分的に加水分解し、高度に精製した肺炎球菌莢膜多糖類(Pn-Ps)は異なる亜種類のストレプトコッカス・ニューモニアの培養物に由来する抗原性多糖類の調製物である。本Pn-Psはそれが由来する特別な肺炎球菌亜種類に依存するが約 $1 \times 10^5$  から $1 \times 10^6$  の平均分子量を持つ。一般的に本新規化合物の分子量は出発物質として使用される組成Pn-Ps調製物と比較して要因により2-10倍減少し、多分散性は約50%減少する。更に、本新規Pn-Ps調製物は約1.0から1.4の分子サイズ・多分散性を持ち、C-多糖類汚染レベルは約3%以下であり、抗原性指数は約0.4から1.1である。この最後の数字は物理的又は化学的分析によって検出されたPn-Ps量と比較した比濁率分析によって検出されたPn-Ps抗原量として計算される。粗製Pn-Psは1.0という値が与えら

れている(ATCCでの寄託物による)。比濁率分析には抗体による抗原の識別及び大部分が沈殿する抗原-抗体複合物の形成の2つを含む。それ故、“抗原性指数”0として登録されるべき沈殿形成に依存しない、抗体による抗原の識別(例えば、抗体結合)を行うことが理論的には可能である。しかし、本発明の新規Pn-Psは抗原性指数が上記の範囲にある方法で調製する。これは本発明により製造されるがこの範囲よりも低い抗原性を持つPn-Psが有用ではないと言うのではない。平易に言えば0.7よりも低い抗原性指数を持つPn-Psが有用な抗-Pn-Ps免疫応答を減少させるのに十分な免疫原性を保持しているかどうかはまだ知られていないということである。更に、新規なPn-Psは抗肺炎球菌免疫応答の発生に有用なPn-Ps-PRO接合体を生産するために免疫原性蛋白質との接合に従い、遊離の、T-細胞独立の多糖類エピトープに対して十分に免疫応答を増加できない、ヒトを含む乳児哺乳類にとって特に重要である。数種の新規なPn-Ps調製物の幾つかの物理的及び化学的特徴を下記の表Iと表IIに示したが、付随する記述はそれらの特徴の測定方法を示している。下記に開示した方法は本発明のPn-Ps化合物を製造するための一つの方法である。同様に、哺乳類の抗肺炎球菌免疫応答を高めるのに有用なPn-Ps-PRO接合体の調製にこの化合物を使用する一つの方法もここに開示している。

#### 【0013】1. 新規な肺炎球菌多糖類(Pn-Ps)の特徴記述

部分的に加水分解した、精製したPn-Psの物理的及び化学的特徴には粗製の細菌培養物由来多糖類と比較して分子サイズが2-10倍減少していることが含まれる。この減少サイズは非接合Psの接合時及び接合後の除去時に多糖類の取扱いを改良し、型特異性Pn-Psの精製度を高め、Pn-Ps分子サイズの多分散性を低め、抗原性を本質的に不変にする。これらの新規なPn-Psの特徴は化学的に高度に明確化され、型特異性の高い抗原性Pn-Ps-PRO接合体の首尾一貫した形成に役立たせるように使用する。

【0014】i. Pn-Ps分子量及び多分散性  
Pn-Ps調製物の多分散性は重量平均分子量、 $M_w$ 、の測定により、拡散、沈降分離又はクロマトグラフ処理及び数平均分子量、 $M_n$ 、により、粘度、氷点降下又は沸点上昇のような束一的特性により比率 $M_w/M_n$ として得られる。この数値が一定のものに近づけば近づくほど多糖類調製物はより均一となる。幾つかのPn-Ps調製物の多分散性をここに示し、この均一性増加を達成するための好ましい方法も開示するものである。粗製の又は部分的に加水分解したPn-Ps分割係数

#### 【化1】

$$Kd = \frac{Ve - Vo}{Vi - Vo}$$

(Vo = カラムの容量)

(Vi = 総浸透量)

(Ve = サンプルの溶出量)

(Kd = サンプルの分割係数)

は技術分野での既知の方法により、多糖類の一部分のサイズ・エクスクリュージョン（分子ふるい）・クロマトグラフィ（SEC）又は高性能サイズ・エクスクリュージョン・クロマトグラフィ（HPSEC）によって測定する。よって得られるKdは多糖類調製物の平均流体力学量の基準である。Pn-Psの分子サイズは開示した方法に従って物理的剪断により又は熱的、音波的又は化学的加水分解により減少するのでPn-Psの溶出量、Veは増加し、Kdも増加する。

【0015】好ましい方法では、この目的のためのカラム・マトリックスはセファロースCL2Bゲル（ファルマシアNo. 17-0120）である。カラムの容量（Vo）はブルー・デキストラン2000（ファルマシアNo. 17-0360-01）を使用して測定し、総浸透量（Vi）は塩化ナトリウムのピーク量から測定する。或る方法によりPn-Psサンプルを2.5mg/ml蒸留水で調製し1mlの注入量を使用する。比率Vo/Viは0.32-0.37の範囲になるべきである。デキストランT500（ファルマシアNo. 17-0320-01）に対するKdは0.37-0.49の間である。好ましいHPSECシステムは、50℃に加熱した7.5×600mmTSK G6000 PWカラムを含む。

【0016】極めて好ましい方法では、SEC又はHPSECは溶出量測定機能として分析物の比較濃度を監視する示差屈折計及び溶出量の測定機能として分析物の比粘度を監視する示差粘度計と連動する。普遍的なキャリブレーション・カーブ〔log（固有粘度は分子量を指定する）対滞留量〕は一連の単分散の酸化ポリエチレン標準物の分析により作成する。濃度と比粘度のプロファイルはサンプルの分子量対溶出量プロファイルの計算に使用できるし、順番にMn及びMwの計算に使用し、それにより多分散性指数（Mw/Mn）を計算する〔ヨー、ダブリュ（Yau, W.W.）〕及びレメンター、エス、ダブリュ（Rementer, S.W.）ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィ（J. Liq. Chromatog.）、13巻、627-675頁（1990年）；ナジ（Nagy）、ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィ、13巻、677-691頁（1990年）；ベノイト（Benoit）等、ジャーナル・オブ・ケミカル・アンド・フィジカル・トゥム（J. Ch. Phys. Tome.）、63、1507-1514（1966）〕 本発明において固有粘度は0.1M磷酸ナトリウム、pH7.2で測定した。一旦、Pn-Ps調製物の平均分子量が決まれば、分子\*50

\* 当りの繰返し単位量の平均数値は、ポリマーの分子量を繰返し単位量の分子量で割ることにより容易に測定される（表II参照）。

10 【0017】ii. Pn-Ps型特異抗原性の保持  
物理的剪断又は化学的、熱的、音波処理又は酵素加水分解を行った各粗Pn-Psに対して抗原性統一性が消散し始める終末点を決定することは重要である。この終末点は粘度を当業界で既知の多くの免疫試験のいずれかと関係づけることによって決定するのが便利である。好ましい方法では多糖溶液の一部をオキタロニー二重免疫拡散検定により肺炎球菌型特異抗体を用いて測定する。拡散後寒天中白色沈降バンドの出現は多糖の抗原としての統一性がそのまま保たれているということである。より定量的免疫検定は速度比濁分析によって得られる。

20 【0018】速度比濁分析は抗原-抗体複合体の生成中に散乱する光強度の変化速度を測定する。反応は光線が通過する反応セル中で行なわれる。本願では特異抗体（Ab）が特異抗原（Ag）即ちPn-Psと反応するとき溶液中で生じる免疫沈降反応によって複合体が生成される。Ag-Ab複合体の生成は最適比率のAg及びAb分子の存在に依存するために一定量のAbに対する複合体生成の程度は最大レベルまでのAg量まで増加しそれ以上多量のAgは複合体生成量が減少する結果となる。従って一定レベルのAbを維持しAg濃度の増加による光散乱を測定することにより標準曲線が生じる。試料をその特異Abと標準曲線を展開するために用いた同様の条件下で反応させる場合Ps（又は誘導化Ps）調製物のAg濃度を計算することが可能である。

40 【0019】速度比濁分析により免疫学的に計算した濃度と化学的又は物理的に得られる濃度（比色分析、屈折率又は単糖類の全加水分析及び定量による—以下参照）との比較はPs試料の抗原性指数を与える。多糖類の乾燥重量分析は粉末調製物の揮発性含有量が既知の場合にのみ適当である。多糖類は吸湿性であることが周知であり、揮発分を5-30重量%で含有する可能性がある。そのような場合その乾燥重量は特に信頼できない。かなり正確に多糖濃度を定量するために用いられる1方法は比色検定でありこの検定は問題の多糖標準液で検定する。例えばPn6B-Ps、Pn18C-Ps、Pn19F-Ps及びPn23F-Psは全てディッシュ（Dische）及びシェトルス（Shettles）〔J. Biol. Chem. 第175巻、595-603頁（1948年）〕のメチルペントース検定によって定量することができる。Pn4-Ps、Pn9V-Ps、Pn14-Ps及びP

11

n19F-Psはヘキサースアミン含有量によって定量しPn9Vもウロン酸含有量によって定量することができる。フェノール - 硫酸検定〔ズーボイス (Dubois) 等、Anal. Chem. 第28巻、350~356頁 (1956年)〕は結合体調製中の工程試験の一部としてこれらのPn-Ps調製物の全てを定量するのに有用である。使用される他の方法は分析物質量の尺度として屈折率シグナルを用いるものでありこれも問題の多糖標準液で校正する。比色検定は誘導化及び結合工程中に試料の多糖含有量を監視するために用いられるがこの方法はHPLSEC-万能検定分析による多糖調製物の物理的確認及び抗原性指数の計算に用いられる。出発粗Pn-Psは抗原性指数値1.0である。相対抗原性指数は実験用試料に対して計算され0.4~1.1、好ましくは0.7~1.1が十分であると思われる。多糖が加水分解及び分画工程中に著しく精製される場合には抗原性指数1.0以上を得ることが可能である。またサイズ縮小だけで多糖分子のフレキシビリティを高めて抗原エпитオプの立体障害を減少させることにより調製物の抗原性指数を増加させることができることは理論上可能である。これらは加水分解、分画及び誘導化Pn-Ps試料の工程チェックとして行なわれる。相対抗原性<0.4を有する試料は除去する。即ち結合に用いない。肺炎球菌多糖類を確認するのに有用である抗Pn-Ps抗体標品は入手可能である。抗Pn-Ps抗体入手先としてはヘルスリサーチ社アルバニーNY及びステートンセルインスチチュートがある。また型特異抗Pn-Ps抗体は免疫源として市販の粗Pn-Psを用いて当業界で既知の方法に従ってこの目的に調製することができる〔バーカー (Baker) 等、イムノロジー第20巻、469頁 (1971年)、ブルック (Brooke)、M. S. J. Immunol. 第95巻、358頁 (1966年)、カーニー (Kearney)、R. 及びハラデー (Halladay)、W. J. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 第48巻、227頁 (1970年)、シュニアソン (Schneerson)、R. 等、Prog. Allergy第33巻、144頁 (1983年)、ロビンス (Robbins)、J. B. Infect. Immun. 第26巻、1116頁 (1979年)〕。

【0020】更に抗原性における完全性が保持されていることの指標はPn-Ps調製物の正しい化学組成が維持されていることである。例えばPn6B-Psは繰返し単位〔 $\alpha$ -Gal (1-3)- $\alpha$ -Glu (1-3)- $\alpha$ -L-Rhap (1-4)-D-リビトール-5-PO<sub>4</sub>(2)〕を有するので炭水化物成分リビトール：ラムノース：ガラクトース：グルコースのモル比は約1：1：1：1である。この割合は例えば多糖を36%フッ化水素酸で45~65℃に於て約2時間次いで2Mトリフルオロ酢酸で100℃に於て約16時間加水分解し、パルス電流検出による高性能アニオン交換クロマトグラフィー処理することによって定量することができ

12

る。従ってほぼ等モル量の炭水化物成分を示す4本のピークは全体性が維持されていることの指標である。実質的に炭水化物成分の理論比は本発明の新規なPn-Ps化合物全てに約20%以内で維持される。理論値からのずれは主として方法技術の限界によるものである。従って全加水分解により

【0021】Pn23F-Psはグリセロール：ラムノース：ガラクトース：グルコース=約1：2：1：1比を有し、Pn14-PsはN-アセチル-グルコサミン：ガラクトース：グルコース=約1：2：1比を有し、Pn19F-Psはラムノース：マンノサミン：グルコース=約1：1：1比を有し、Pn18C-Psはグルコース：ガラクトース：ラムノース：グリセロール：アセテート=約3：1：1：1：1を有し、Pn9V-Psはグルコース：ガラクトース：N-アセチル-マンノサミン：グルクロン酸：ガラクトン酸：アセテート=約2：1：1：1：1：1.7比を有し、Pn4-PsはN-アセチル-マンノサミン：N-アセチル-フコサミン：ガラクトサミン：ガラクトース：ビルベート=約1：1：1：1：1比を有する。更にPn4-Psは最近Pn5-Psと同様に、HPLC分析で同定して2-アミノニューモサミン (2-アミノ-2,6-ジデオキシタロース) であると思われる成分を含有することが見い出されている〔バーカー (Barker) 等、炭水化物研究 (Carbohydrate Res.) 224~233頁 (1966年)〕。Pn19F-Psはもう1つ別の成分恐らくヘキサースアミンを有しこれは文献に報告されておらず最終的同定はまだ未決定である。これらの及び別の理論上の多糖繰返し組成物は次の参考文献J. E. Gバンダム (Van Dam) 等、Carbohydr. Res. 第187巻、267頁 (1988年)、H. J. ジェニングス (Jennings)、Adv. Carbohydr. Chem. 第41巻、155頁 (1983年) 及びこの中の参考文献J. C. リチャーズ (Richards) 及び M. ペリー (Perry)、Biochem. Cell. Biol. 第66巻、758頁 (1988年) に報告されている。炭水化物成分のはかに問題のPn-Psのいくつかにはホスフェート、アセテート及びビルベート側鎖基があり、これらのあるものは免疫優性基である。これらの成分はそれ自体をモニターすることもできる (実施例30参照)。単糖類の定量はまた試料中の全Pn-Ps濃度を定量するのに有用な手段である。

【0022】更に主題の多糖類の抗原性に必要な要素は、多糖類において“構造的にエピトープ”と呼ばれているものを保持することである〔例えばウェッセルス (Wessels)、M. R. 及びカスパー (Kasper)、D. L. J. Exp. Med. 第169巻、2121~2131頁 (1989年) 参照〕。このレベルの抗原性は多糖の高分子量形でのみ発現されると思われるここに記載される方法はこの多糖免疫原性レベルの保存にも向けられる。

## 【0023】iii. 最少のC多糖混入

もう1つの重要なパラメーターはC多糖混入レベルである。この数値は多糖調製物を全酸加水分解し、加水分解物のクロマトグラフィーを行ってコリンを電導度で検出することによって示すことができる。また非加水分解多糖をNMRによってコリンを分析することができる。NMR手法はC-Ps含有量を計算するためにラムノースメチルシグナルに対するコリンシグナル比(ラムノースを含有するPn-Ps用、他のPn-Psでは異なったシグナル)を用いる。クロマトグラフィー法では電導度検定によって定量した多糖含有量又はPn-Ps成分の1種に対するコリンシグナル比を用いてC-Ps含有量を計算する。いずれの方法でも既知濃度のコリン標準品からC-Psの理論上の繰返し構造を用い、1度コリン濃度が知られている多糖標品に存在するコリンレベル\*

\*を直接計算することができる〔ハーマンス(Hermans)等、Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 第107巻、600頁(1988年)〕。Pn-Ps試料の多糖濃度は当業界で既知の方法に従って測定される。例えば全多糖濃度は多糖の全加水分解及び特異単糖濃度の測定によって求めることができる。C-Ps濃度を全多糖濃度と比較することによってC多糖混入度(w/w)が求められる。全多糖の3%(w/w)以下のC多糖レベルならば容認できるが更に好ましいレベルは1%以下である。2ロットのPn6B-Ps及び2ロットのPn23F-Psの化学的および物理的性質を以下の表Iにまとめる。これらのデータは本明細書に記載される新規な方法によって生じるロット間パラメーターの再現性を示す。

## 【0024】

表 I

加水分解して分画したPn-Psの特徴

Pn-Ps調製物	6B-1	6B-2	23F-1	23F-2
終末粘度	1.094	1.147	1.350	1.376
Kd (HPSEC)	0.62	0.62	0.49	0.49
Kd (CL-2B)	0.64	0.60	0.41	N. D.
単糖	S	S	S	S
抗原性				
オキタロニー	S	S	S	S
比濁法	S	S	S	S
(フェノール:硫酸)	S	S	S	S

S:良好

以下の表IIには数種の粗肺炎球菌多糖類及び本発明の30※実験誤差と調製される複合多糖化合物の検出限界内の近  
 対応する加水分解して分画した(Hyd+frac)化合物の化  
 学的及び物理的パラメーターを示す。表わされる数字は※ 似値である。  
 【0025】

表 II

粗及び新規な加水分解+分画Pn-Ps化合物の物理的及び化学的特性

Pn-Ps	ピーク	固有粘度	重量平均
型	Kd		分子量(Mw)
4-crude	0.55 ± 0.05	4.34 ± 10%	4.2 × 10 <sup>5</sup> ± 20%
4-hyd+frac	0.69 ± 0.05	1.0 - 3.0	1 × 10 <sup>5</sup> - 5 × 10 <sup>5</sup>
6B-crude	0.40 ± 0.05	2.67 ± 10%	1.4 × 10 <sup>6</sup> ± 20%
6B-hyd+frac	0.60 ± 0.05	1.0 - 2.0	3 × 10 <sup>5</sup> - 7 × 10 <sup>5</sup>
9V-crude	0.53 ± 0.05	2.29 ± 10%	1.1 × 10 <sup>6</sup> ± 20%
9V-hyd+frac	0.65 ± 0.05	1.0 - 2.0	3 × 10 <sup>5</sup> - 7 × 10 <sup>5</sup>
14-crude	0.50 ± 0.05	1.69 ± 10%	1.1 × 10 <sup>6</sup> ± 20%
14-hyd+frac	0.60 ± 0.05	0.6 - 1.6	4 × 10 <sup>5</sup> - 1 × 10 <sup>6</sup>
18C-crude	0.50 ± 0.05	5.20 ± 10%	8.7 × 10 <sup>5</sup> ± 20%
18C-hyd+frac	0.65 ± 0.05	1.5 - 3.0	2 × 10 <sup>5</sup> - 6 × 10 <sup>5</sup>
19F-crude	0.44 ± 0.05	2.95 ± 10%	1.0 × 10 <sup>6</sup> ± 20%
19F-hyd+frac	0.65 ± 0.05	1.0 - 2.0	2 × 10 <sup>5</sup> - 6 × 10 <sup>5</sup>
23F-crude	0.36 ± 0.05	4.15 ± 10%	2.2 × 10 <sup>6</sup> ± 20%
23F-hyd+frac	0.54 ± 0.10	1.5 - 3.0	4 × 10 <sup>5</sup> - 8 × 10 <sup>5</sup>

15		16		
P n - P s	数平均	多分散性	繰り返し単位	C - P s
垂 型	分子量 (M <sub>N</sub> )	(M <sub>w</sub> /M <sub>N</sub> )	数/分子	%
4-crude	: 3.3×10 <sup>5</sup> ±20%	1.2 - 1.6	> 600	> 3
4-hyd+frac	: 2×10 <sup>5</sup> -4×10 <sup>5</sup>	1.0 - 1.4	< 600	< 3
6B-crude	: 9 × 10 <sup>5</sup> ±20%	1.5 - 2.5	>1000	> 3
6B-hyd+frac	: 3×10 <sup>5</sup> -6×10 <sup>5</sup>	1.0 - 1.4	<1000	< 3
9V-crude	: 9 × 10 <sup>5</sup> ±20%	1.2 - 2.5	> 800	> 3
9V-hyd+frac	: 3×10 <sup>5</sup> -6×10 <sup>5</sup>	1.0 - 1.4	< 800	< 3
14-crude	: 7 × 10 <sup>5</sup> ±20%	1.3 - 2.5	>1200	> 3
14-hyd+frac	: 3×10 <sup>5</sup> -8×10 <sup>5</sup>	1.0 - 1.4	<1200	< 3
18C-crude	: 6 × 10 <sup>5</sup> ±20%	1.4 - 2.5	> 700	> 3
18C-hyd+frac	: 2×10 <sup>5</sup> -6×10 <sup>5</sup>	1.0 - 1.4	< 700	< 3
19F-crude	: 6 × 10 <sup>5</sup> ±20%	1.8 - 2.5	>1000	> 3
19F-hyd+frac	: 2×10 <sup>5</sup> -6×10 <sup>5</sup>	1.0 - 1.4	<1000	< 3
23F-crude	: 1 × 10 <sup>6</sup> ±20%	2.0 - 3.0	>1000	> 3
23F-hyd+frac	: 2×10 <sup>5</sup> -6×10 <sup>5</sup>	1.0 - 1.4	<1000	< 3

【0026】B. 本発明の新規なP n - P s化合物の製造方法

この方法を開示するにあたって、以下の諸段階を説明する：

- 未精製肺炎球菌多糖、P n - P sの単離；
- 未精製P n - P sの部分的加水分解又は機械的剪断 (shearing)
- 本発明のP n - P s生成物を製造するための、大きさ及び純度に応じた、部分的に加水分解した肺炎球菌多糖の分画化。

【0027】a) 未精製肺炎球菌多糖の単離

肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumoniae) を培養して、周知の方法〔実施例3、及びWilliams, C. A., 及びChase, M. W., "Methods in Immunology and Immunochemistry" (「免疫学と免疫化学における方法」)、Vol. I. Academic Press (1967)) によって未精製肺炎球菌多糖を回収する。病原体は、PNEUMOVAX (商標) 23に用いられる23のすべての肺炎球菌多糖の未精製の製品として、ATCCから入手できる。これらの粉末状多糖を、この方法の出発物質として用いてもよいし、または、病原体を成長させて多糖を以下のように単離してもよい。すなわち、簡単に言えば、この分野で肺炎球菌の成長を維持するのに適当であることが知られている栄養培地内で細菌を大規模培養した後に、未精製多糖を得る。フェノール又はトルエン等の殺菌剤を加えて生体を殺す (実施例3)。その後、2段階の多糖のアルコール分画化を行なう。最初の段階では低濃度のアルコールを殺菌処理したものに加えて、未精製P n - P sは溶液に溶かしたまま、細胞残渣及びC-多糖等の他の不要な不純物を沈殿させる。つづいて、試行規模において前もって決定しておいた濃度の水と混和するアルコールをさらに加えて、荚膜多糖を沈殿させて、上澄み中にさらに残った不純物をとりのぞく。P n - P sを水性媒質に再懸濁した後、核酸又は\*

\*タンパク質加水分解、あるいは溶媒抽出等の周知の方法で不純なタンパク質と核酸をとりのぞく。未精製多糖をアルコール沈殿させて回収し、乾燥して未精製P n - P sの粉末を形成する (実施例3)。

【0028】b) 粗P n - P sの部分加水分解又は機械的剪断

実質的に上述の通り調製した粗多糖〔以下の実施例3も参照〕は、成人及び2才以上の子供を使用目標とした肺炎球菌ワクチンを処方するために非結合状態で用いられている。次の処理工程は結合体ワクチンの製造に有用なユニークな定義の化学的及び物理的性質 (表II参照) を有する新規な部分加水分解された精製P n - P s生成物を生成させる。粗P n - P sのサイズ縮小は、高純度P n - P s生成物を得るための次の精製工程の成功に効果がある。更に結合体を調製するために用いる場合、本発明の新規なP n - P sを使用するときの結合は更に能率が高い。これは粗多糖物質の水溶液が非常に粘性で可溶性が不十分であり、その結合体が非常に不溶性であるためである。そして、結合方法はこれ自体実施が困難であり、低収率の結合体が生じる。更に最終結合体からの非結合P n - P sの除去は、前結合P n - P sがサイズの縮小、粘度の低下及び改良された溶解度を有する場合に容易である。これは結合体調製物中の遊離P n - P sの存在が、投与される結合体P n - P sの実際の投与量を推定することを困難にする点で重要であり、著しいT細胞刺激作用を有する結合P n - P sであるほど、非結合P n - P sの存在は免疫学的に「適切」なP n - P sの減少を示す。

【0029】上記で調製した乾燥粗荚膜多糖は、またP n 14 - P sとして実施例4に示される通り、部分加水分解の前又は後に、例えばアニオン交換クロマトグラフィー、又は他のクロマトグラフィー法で精製することができる。クロマトグラフィー吸着-脱着は、正あるいは負として使用することができる。正の方法では、P n -

P<sub>n</sub>Sを樹脂に吸着させて溶液中に不純物を残し、P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>脱着前に洗い流す。負の方法では、不純物をP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>溶液から吸着させて捨て、精製された状態の溶液中P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>を残す。また、P<sub>n</sub>6B-P<sub>s</sub>として実施例2に示される通り、部分的熱加水分解又は他の既知の加水分解手段、例えば化学的、酵素的又は物理的（例えば、高圧セル又は音波分解）手段に直接かけることもできる。溶液粘度又は高性能サイズ排除クロマトグラフィーで都合よく測定される加水分解の標的終末点は、多糖の抗原性が妨げられないようなパイロットスケールで各々の多糖に対して予め決定される。上で述べたように抗肺炎球菌型特異抗体を結合する名目上の能力は、同濃度の粗P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>出発物質に示される結合の40%以上であることが良好とみなされる。部分加水分解は水性媒質中、好ましくは5〜110℃で、約1〜48時間限定熱処理によって達成される。5秒から5分の限定高エネルギー音波処理は、所望粘度又はK<sub>d</sub>終末点に達するのに必要な回数だけ、冷却時間をおいて繰返す。音波加水分解法は、熱加水分解より好ましく、多糖類は複合構造を有する（以下参照）。多糖類の部分加水分解を行なう本技術分野で既知の他の適当な手段も利用することができる。例えば酸による限定化学的加水分解、細胞内崩壊酵素処理又はブレンダー、ミル又は高圧セルに於ける物理的剪断もまた平均P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>鎖サイズを縮小するために使用することができる。好ましい実施態様では、P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>をホモジナイザーに所定の温度約0〜30℃、圧力約2,000〜15,000PSIで通過させて物理的剪断にかけてサイズ、多分散性及び抗原性の望ましい特徴を有するP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>生成物を得る（実施例18参照）。

【0030】溶液粘度又は高性能サイズ排除クロマトグラフィーで都合よく測定される加水分解の標的終末点は、多糖の抗原性が妨げられないようなパイロットスケールで各々の多糖に対して予め決定される。上で述べたように抗肺炎球菌型特異抗体を結合する名目上の能力は、同濃度の粗P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>出発物質に示される結合の40%以上であることが、反復単位の構造に関係のある配列関連エピトープに加え、多糖のコンホメーションのエピトープを含む点において良好とみなされる。これは実質的に低いM<sub>n</sub>、M<sub>w</sub>又は繰返し単位数／分子（表I）を有するP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>が、この方法で生成させることができず速度比濁検定の場合、上で決めた40%以上のカットオフを反応させることができないようなP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>が結合により動物の免疫原性であることができることを言うのではない。これは型特異抗P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>抗体と結合し沈殿させる著しい能力がないにもかかわらず、結合\*

\*状態の低分子量P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>が哺乳類免疫系に認識され、良好な型特異抗肺炎球菌応答を生じることができることを言うのである。この場合“抗原性”は一定のP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>調製物の受容又は排除の操作基準としての“免疫原性”に置き換わるべきである。しかしながら実際には方法制御として生体内免疫原性パラメーターより試験管内抗原性を使用することが最も便利である。

【0031】一般に、同様のサイズ縮小方法はほとんどの多糖類に応用することができる。しかしながらP<sub>n</sub>6B-P<sub>s</sub>は、広範囲の熱的サイズ縮小で抗原性を保持するが、P<sub>n</sub>23F-P<sub>s</sub>及び他の複合体多糖は構造上の統合性を失い（グリセロールリン酸側鎖）、音波処理又は物理的剪断手段によって達成し得る穏やかなサイズ縮小を必要とする。例えば、ゴーリンホモジナイザーでの物理的剪断は、いくつかの理由で好ましい方法である。まずこの方法は規模を拡大することができる。第2に音波及び熱加水分解は一般に多分散性1.0〜1.5を得るために加水分解されたP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>の追加分画を必要とする。しかしながら物理的剪断方法は、一般に更に分画せずにこの範囲に入る多分散性を有するP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>生成物を生じるが、純度を更に高め、多分散性とCP<sub>s</sub>混入の減少を得るために分画してもよい。第3に物理的剪断方法は、熱又は音波加水分解手段と比較した場合、一定のP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>について再現性及びスケール能力が高いという長所がある。第4に物理的剪断方法は、音波又は熱加水分解によって生成した同一サイズのP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>より一定のサイズに対して高い抗原性を保持することがあるというP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>生成物の生産に於ける利点があると思われる。

【0032】P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>平均分子量に関係する粘度は、監視するのに便利な工程中のパラメーターであり、サイズ縮小の程度を限定及び制御するために加水分解中に容易に続けられる。P<sub>n</sub>6B-P<sub>s</sub>及びP<sub>n</sub>23F-P<sub>s</sub>の化学的及び物理的に区別できるロットは多糖を一致した標的終末粘度（上記表I参照）までサイズを縮小することによって簡単に調製されている。このような工程中の粘度測定の使用は、広範囲の粗多糖類に応用することができ、得られたP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>抗原性の特徴を変化させずに加水分解サイズを減少させる。上述した通り、抗原性の保持は例えばウフクロニー二重免疫拡散検定、速度比濁分析又は当業界で既知の他の方法によって容易に確かめられる。0.9%塩化ナトリウム（食塩水）中数種のP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>調製物の1mg/ml溶液の標的終末粘度を以下の表IIIに示す。これらの数値は他のP<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>亜型に同様に適用することができる。

表 III

粗及び加水分解P<sub>n</sub>-P<sub>s</sub>の溶液粘度

P <sub>n</sub> -P <sub>s</sub> 亜型	粗P <sub>n</sub> -P <sub>s</sub> の粘度 (センチストークス)	標的終末粘度 (センチストークス)
-----------------------------------	---	----------------------



19		20
Pn4-Ps	1.8	1.5-1.00
Pn6B-Ps	1.4	1.3-1.00
Pn9V-Ps	1.4	1.3-1.00
Pn14-Ps	1.2	1.1-0.95
Pn18C-Ps	2.0	1.5-1.00
Pn19F-Ps	1.4	1.3-1.00
Pn23F-Ps	1.6	1.5-1.00

ある肺炎球菌多糖類の場合には、部分加水分解の前又は後にイオン交換工程のような別の精製工程を含むことが有益である。Pn14-Psの場合には、この工程は音波部分加水分解の前にアニオン不純物のWhatmanDE52による吸着によって達成される。わずかに中正である多糖を加水分解に備えて上清画分として回収する。同様の操作がPn7F-Psのような他の中性多糖にも適用できることは当業者にとっては明らかである。

【0033】Pn6B-Ps調製物の分子量値は、サイズ縮小及び分画前は約900キログルトン(KD)、後は約300KDである。Pn23F-Psの各数値は前が約100KD以上後が約400~500KDである。従って約500±約300キログルトンまでのPn-Psサイズの縮小が各Pn-Ps亜型工程のこの相の適当な目標である。部分加水分解された物質を、所定濃度のアルコールで再沈降させると以下の(c)項で記載される部分加水分解されたPn-Psを回収し更に精製することができる。

【0034】c) サイズ及び純度による部分加水分解Pn-Psの分画

Pn-Ps調製物の多分散性は、亜型特異Pn-Ps鎖長の分散を示すばかりではなく、群特異C多糖並びに他の混入物がPn-Ps調製物に残存していることも示している。上で述べた通り、残留C多糖の混入は有用ではなく逆の免疫応答に関連することさえある。狭い範囲の多糖平均分子サイズ(多分散性の低下)の選択は、サイズ縮小後示差アルコール、例えばエタノール好ましくはイソプロパノール(IPA)溶解によって達成するのが便利である。この選択の根拠は、一定のPn-Ps調製物に対してアルコール溶解度が鎖長に逆比例し、また分子量に比例することである。従ってこの方法は、出発のサイズ縮小Pn-Psより著しく改良された均一性を有する一致した大きさの分子集団を量的に単離するのに良好に適用されている。IPA分画の工程中制御は、Pn-Psが沈降するIPAの範囲を予想するパイロット実験を行なうことによるものである。抗体特定ネフェロース検定は分画を監視するために使用して量的Pn-Ps回収を確かめる。この改良により、多くの異種肺炎球菌単離物に共通の、C多糖群特異多糖による混入は、粗Pn-Ps調製物に見られるレベルより約3~20倍減少する。更にPn-Ps調製物の分子サイズ多分散性は約1.0~1.4に付随して減少する。

【0035】サイズ縮小Pn-PsのIPA分画に対す\*50

\* 別の方法は、適当なサイズ排除樹脂、例えばCL-2B樹脂又は200~1000キログルトン分子量範囲の多糖を含み、分画することができる他の樹脂によるサイズ縮小水性Pn-Psのクロマトグラフィーである。厳密なサイズ排除マトリックスを用いるHPSECは、この点で便利であり、分画能の遅れと増加を減少させる。所定の粘度又は保持時間又はオンライン検出によるカラムから溶離する画分の選択は、上で開示したサイズ、粘度及び純度の望ましい特徴を有するPn-Ps分子集団を得る。IPA又はクロマトグラフィー分画の別の工程を用いたPn-Psの調製物は、化学結合工程中、更に一致して行動して再現性のある特徴を有する結合体を生産させる。Ps-Ps純度の付随した著しい増加も得られ、特にCpsレベルは非常に低下する。上述の操作と測定の結果としてPn-Ps中間体の好ましい特徴は上記表IIに示した通りである。

【0036】本発明の新規なPn-Ps生成物は、多くのやり方で利用できる。1つの好ましい適用においては、Pn-PsをT細胞依存キャリアーに接合する。この接合を行なう非常に好ましい方法の1つは、米国特許第4,695,624号;第4,830,852号;第4,882,317号;1991年1月28日提出の米国出願第646,570号(Merck Case #18108)に開示されている。本出願書中の実施例3,5,7及びその他も参照のこと。1つの好ましい実施例においては、接合生成物を水酸化アルミニウムゲルに吸着させる。これは、たとえば、濃度20μg/mlのPn-Psと当量の接合した保存溶液を製造して行なう。一定量を滅菌した水で1:1,1:5及び1:10に希釈する。20μg/ml保存溶液の一定量を含めたこれら各サンプルの一定量を、0.85mg/ml Al<sup>3+</sup>、1.7%(w/v) NaCl及び100μg/mlチメロゾールを含んだ水酸化アルミニウム希釈液で1:1に希釈する。溶液のpHを1N NaOHで約7.5に調整して、その結果、Pn-Ps濃度10,5,2及び1μg/mlの溶液とする。これら各調合物の約0.1~0.5mlの服用量が、様々の年齢や体重にわたる服用者に対する投与に適している。前述のように処方した接合ワクチンが生後2~3カ月のサルにおいて、Pn6B-Ps-OMPC、Pn19F-Ps-OMPC、Pn14-Ps-OMPC及びPn23F-Ps-OMPCに対するサブタイプ特異的な抗肺炎球菌多糖免疫反応をいちじるしく高めることが知られている。さらに、Pn-P



s-OMPC接合ワクチンは、無胸腺症マウスにおいて、T細胞依存性があることが知られている。

【0037】ここに述べたことから明らかなように、ここで定義した特性を持つ他の多糖及びそれらの特性を持つPsを作る方法は、部分的に加水分解して分画化した肺炎球菌多糖以外の接合体の製造において有用な適用ができる。そしてこれらの接合体を、他の病原微生物がひきおこす疾患の予防に用いることができる。たとえば、新生児髄膜炎の原因であるBグループ連鎖球菌、幼児髄膜炎の原因である髄膜炎菌(Neisseria meningitidis) 10又は、尿路、髄膜炎又は他の通性感染症の重要な原因である大腸菌(E. Coli)を、多糖源として用いることができる。

【0038】これらの新規なPn-Ps化合物の別の利用方法は、1つ又はそれ以上の接合した形態の部分的に加水分解して分画化したPn-Ps化合物を含む混合物の製造である。このようにして、これらの化合物の純度を向上させることによって、23価又は14価のワクチン以上の混合物を製造することができる(“Physicians Desk Reference”(「医師用卓上便覧」)1990年 20版p1431参照)。このような混合物は、新規なPn-Ps化合物それぞれを約50μg/ml含み、筋肉内又は皮下に投与されるべきである。ここに掲げたどのPn-Psサブタイプも、全服用量約25μg、つまり約0.5mlで十分である。接合したPn-Psと遊離Pn-Psのいずれも、塩化ナトリウムに防腐剤を加えたもの等の不活性担体の他に、さらにPedvax HIB(商標)等の抗菌化合物、抗インフルエンザ抗原等の抗ウイルス化合物、あるいは、アジュバント等の免疫調節物質を含んでよい。これらの多糖及び多糖による共有結合接合体はまた、複合ワクチン処方 30の重要な成分を提供する。このような複合処方には、たとえば、免疫学的効果を有する量のFreundsアジュバントやRibiaアジュバント、又は免疫調節化合物、たとえばインターロイキン、インターフェロン(Market Letter, Nov. 30, 1987, p26~27; Genetic Engineering News, Jan. 1988, Vol. 8, p23等を参照)、あるいは付加的な免疫原を含んでもよい。好ましい実施例において、免疫学的に効果のある量の本発明のPn-Psを有する混合物は、B型肝炎、A型肝炎、非A非B型肝炎、エイズ、ジフテリア、百日咳、破傷風、はしか、おたふくかぜ、風疹、不活化したポリオ、水痘又はインフルエンザ菌(Haemophilus influenzae b)に対する 401つ又はそれ以上のワクチンとともに含まれる。ここに述べたものの中から選んだ、加えるのが好ましいワクチンは、Pevax HIB(商標)、Recombivax HB(商標)、M-M-R(商標)、及び3価DTPワクチンの中から選択する。本発明の新規なPn-Ps生成物の、これらの及びその他すべての使用法は、当該説明の範囲に含まれると考えるべきである。以下の実施例は、説明 50

をさらに明らかにするために示されるものであって、本発明を制限するものと考えてはならない。

【0039】

【実施例1】

ストレプトコッカス ニューモニアエ サブタイプの培養及び粗製Pn-Psの単離

【0040】I. ニューモコッカスの培養

ニューモコッカスの培養方法は当業界で公知である(Chase, M.W., Methods of Immunology and Immunoch 10emistry 1, 52(1967))。ニューモコッカルサブタイプの単離物はATCCから入手可能である。この微生物は被包性、非運動性、グラム陽性、ランセット形の血液寒天上でα溶血性である双球菌として同定されている。サブタイプは特異的抗血清を使用するクエリング(Quelling)反応に基づき区別されている。主及び貯蔵種子培養物は凍結されているかあるいは8℃以下にすることが好ましい。好ましい培養方法においては、貯蔵培養物をハート インフュージョン ブロス(Heart I 15nfusion Broth)でもとに戻し、10%脱フィブリン化したウサギ血液を含む、ハート インフュージョン寒天上で培養し、37±2℃で約18時間インキュベートする。このプレート上の増殖物をハート インフュージョン ブロスに再浮遊させ、この再浮遊した増殖物の一部を10%脱フィブリン化したウサギ血液を含むハートインフュージョン ブロス100mlに接種し、37±2℃で約18時間固定培養としてインキュベートする。100mlの液化培養物(処理種子(workingseed))の純度をグラム染色した点及びハート インフュージョン血液寒天プレート上の増殖に対する顕微鏡観察により調 20べる。この処理種子を14日迄の間2-8℃で保存して、すぐに使用する。デキストロース(25g/リッター)を含むニューモコッカス接種原培養基(YUF)を含む2リッターエルレンメイヤーフラスコあるいは適当な容器に処理種子を接種し、37±2℃で約8-24時間固定インキュベートさせる。インキュベーション時間は特に発育するストレプトコッカス ニューモニアエのタイプに依存して変わる。発酵のpHは光学密度1.5-4.0に到達する迄12%炭酸水素ナトリウム溶液の断続的な添加により目標pH範囲6.0-7.2を維持 30するように調整する。光学密度は660nmでモニターする。増殖物の試料を顕微鏡的に観察し、血清学上の凝集反応を純度のチェックのために行う。この段階の増殖物を蒸留水、ニューモコッカス種子培地に対する成分の乾燥充填物(YUF)、酵母エキスを限外濾過物、UCON、及びデキストロース(約25g/リッター)の成分からなる40リッターのニューモコッカス発酵培地を含む種子発酵槽に移す。培養物を37±2℃で温和な攪拌下約2-12時間インキュベートする。このpHを水酸化ナトリウム溶液の断続的な添加により6.0-7.2に制御する。蒸留水、ニューモコッカス産生培地に対 4050

23

する成分の乾燥充填物(YUF)、酵母エキスを限外濾過物、UCON及びデキストロース(約25g/リッター)の成分からなる525リッターのニューモコッカス発酵培地を含む発酵槽を約50リッターの一つの2-12時間種子培養物で接種する。培養物を37±2℃で温和な攪拌下6-30時間(この時間は発育のタイプに依存する)インキュベートさせる。このpHを水酸化ナトリウム溶液の断続的な添加により6.0-7.2に制御する。この発酵の光学密度を決定し、デキストロースがもはやpHを変化させないように完全に利用された時に発酵を終了させる。発酵終了後病原性微生物をすぐに中和する。この中和は約1%の濃縮物にフェノールを添加させ、周囲温度で2-12時間進行させることにより達成される。

#### 【0041】II. 粗製Pn-Psの単離

細胞破片及び核酸が浮遊するに十分な量で変性アルコールを中和した培養物に添加し、遠心分離により取り除く。次いで粗製ポリサッカライドを更なる変性エタノールの添加により上清液から浮遊させる。この固形物を遠心分離により集め上清液を捨てる。核酸の混入はポリサッカライドの中性水性溶液、例えば1-5%酢酸ナトリウム、あるいは0.05Mリン酸緩衝液、への可溶化を減少させるのでヌクレアーゼ及び0.01M塩化マグネシウムを添加する。約36℃で約60-120分後、pHを約8.0に調整し、トリプシンのようなプロテアーゼを蛋白質混入物の消化のために添加する。変性アルコールあるいはイソプロパノールを使用する酢酸ナトリウム中のポリサッカライドの再浮遊、続く蒸留水での再可溶化により更なる不純物を除去する。約8℃でのセトリモニウム臭化物の添加により不純物を浮遊させ遠心分離により除去する。酢酸ナトリウム及び一部分の変性アルコールあるいはイソプロパノールの添加は更なる不純物を除去させる。ポリサッカライドは更なるアルコールの添加及び遠心分離により回収される。この浮遊物を白色粉末が得られるまで無水エタノールで洗浄する。このポリサッカライドを濾過によって集め、無水エタノール及びアセトン洗浄、真空下での乾燥により粗製Pn-Psを粉末として得る。

#### 【0042】

#### 【実施例2】

部分的に加水分解され、精製されたPn6B-Psの調製

(1) 熱加水分解: 粗製Pn6N-Ps粉末の3.0g部分を攪拌しながら室温で約4時間1200mlの生理食塩水(0.9%NaCl)に溶解させ、4℃で一晩保存した。次いでこの溶液をコールドフィンガー(cold-finger)還流冷却器中100℃で24時間加水分解し、室温まで冷却した。酢酸ナトリウム試薬(59.7g)を最終濃度3%(w/v)になるように添加した。

(2) 血清学的プローブ: 試料10ml部分につき、イ

24

ソプロパノール(IPA)分別予備研究及び抗体指示終点ネフェローゼ検定を行ったところ、Pn6B-Psは40-50%IPAで浮遊することを示した。

(3) 第一IPA添加: 加水分解した試料(容量1210ml、上記工程1から)を932mlIPAの添加(室温で攪拌しながらの滴下)により43.5%IPAにした。この試料を15-30分間攪拌させ、次いで11000×gで30分間遠心分離(ベックマンJA-10ローター; 8000rpm; 20℃)した。この不毛のペレットを250mlオムニミックスジャー(Omnimixer)中無水エタノールで摩砕し、次いで60ml焼結ガラス漏斗上で集めた。この浮遊物を直接漏斗上で無水エタノール、次いでアセトンで洗浄し、CaCl<sub>2</sub>上室温で真空乾燥して分析用試料を調製した。

(4) 第二IPA添加及び産物回収: 43.5%IPA上清液(容量2020ml、上記工程3から)を室温で攪拌しながら93.5mlIPA滴下により46.0%IPAにした。この試料を熱成し、上記工程3でのように遠心分離した。このペレットを上記工程3でのように摩砕、採集、洗浄、乾燥した。このPn6B-Psは1650mgであり、Kdは0.62であり、3.3%のリンを含んでいた。

#### 【0043】実施例3

S. ニューモニアエ6B-OMPcを接合したPn6B-Ps-OMPc

【0044】A. ダウエックス50×2テトラブチルアンモニウム樹脂(ダウエックス50(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>))の調製

ダウエックス50×2(200-400メッシュ)H<sup>+</sup>型(72g)を水にスラリーさせ、カラムに充填し、水、6N HClの順で洗浄し、次いで流出液がpH紙で中性になるまで水で洗浄した。水酸化テトラブチルアンモニウムの10%水溶液を流出液が強アルカリになるまでカラムに通した。最後に、流出液が再び中性になるまで水をカラムに通過させた。

#### 【0045】B. Pn6B(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)

サイズが減少し、分別したPn6B-Ps(600mg)(物理特性に対する表IPn6B-Psロット1参照)を滅菌蒸留水(60ml)に溶解し、この溶液を全ての固体が溶液になるまで(1.5時間)電磁的に攪拌した。このポリサッカライド溶液を洗浄した樹脂に載せ重力により通過させた(4.5時間)。このカラムを水(10-12ml)洗浄し、合わせた流出液を凍結乾燥して640mgの乾燥Pn6B-Psテトラブチルアンモニウム塩、Pn6B(n-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)を得た。

#### 【0046】C. Pn6B-BuA<sub>2</sub>

Pn6B(n-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)(640mg)をジメチルスルホキシド(DMSO)(24ml)に溶解し、電磁的に30分間攪拌させて全ての固体が溶液になった。この混合物に1, 1'-カルボニルジイミダゾール(44.2

25

mg)を添加し、反応物を室温で撹拌した(60分)。別のフラスコにおいて、水(16ml)中のブタンジアミン二塩酸塩( $\text{BuA}_2 \cdot 2\text{HCl}$ , 1.022g)の溶液を10N NaOHの添加により塩基性にした(pH10.2)。この溶液を0.2 $\mu\text{m}$ 滅菌フィルターに通過させ、氷浴中で冷却した。活性化ポリサッカライドを含む熟成したDMSO混合物を冷却 $\text{BuA}_2 \cdot 2\text{HCl}$ 溶液に、ゆっくり一定の流れで加え、得られた溶液を0℃で撹拌した(15分)。この反応混合物を室温まで暖め、更に1時間撹拌し、その後透析管に移して以下の条件で透析した(4℃): 1) 15リッター、0.1M、pH7.0、りん酸ナトリウム緩衝液、6時間; 2) 15リッター、0.01M、pH7.0、りん酸ナトリウム緩衝液、12時間; 3) 15リッター、0.01M、pH7.0、りん酸ナトリウム緩衝液、9時間; 4) 15リッター、蒸留水、17.5時間; 透析管の内容物を凍結乾燥して222mgのPn6B-1,4-ブタンジアミン(Pn6B-BuA<sub>2</sub>)を得た。この物質約5mgのNMR(300MHz、D<sub>2</sub>O)は、Pn6B- $\text{Ps}$ のブタンジアミンメチレン及びラムノースメチルプロトンの共鳴の積分を比較することにより、100Pn6B- $\text{Ps}$ 繰り返しモノマー単位当たり22ジアミン残基を載せていることを示した。

#### 【0047】Pn6B-BuA<sub>2</sub>-BrAc

Pn6B-BuA<sub>2</sub>(210mg)をpH9.04、0.1Mコルトホッフホウ酸-りん酸緩衝液(21ml)に溶解し、この混合物を溶液になるまで30分間電磁的に撹拌した。この水溶液にアセトニトリル(2.6ml)中のp-ニトロフェニルプロモアセテート(210mg)からなる混合物を添加し、反応物を一晩撹拌した(20時間、4℃)。この溶液を透析管に移して以下の条件で透析した(4℃): 1) 15リッター、滅菌蒸留水、12.3時間; 2) 15リッター、滅菌蒸留水、8.25時間; 3) 15リッター、滅菌蒸留水、5.5時間; この内容物から1.7mlを検定(NMR及びHPLSEC-ユニバーサル口径測定あるいは分子サイズ分析)のために取り出し、次いで乾燥したpH8のりん酸ナトリウム緩衝塩(0.1M、pH8のりん酸ナトリウム溶液の凍結乾燥により調製)0.449gを加えた。完全に溶解した後(30分)、この溶液を0.2 $\mu\text{m}$ 滅菌フィルターに通過させてPn6B-BuA<sub>2</sub>-BrAcのpH8を得た。

#### 【0048】Pn6B-OMPC

Pn6B-ポリサッカライド

蛋白質

Pn6B- $\text{Ps}$ /OMPC

フリーPn6B- $\text{Ps}$

S-カルボキシメチルホモシステイン/リジン

S-カルボキシメチルシステアミン/リジン

0.33mg/ml

2.2 mg/ml

0.15

<5領域%

7.7 %

1.6 %

#### 【0049】

※50【実施例4】

26

\*滅菌OMPC(40ml、4.5mg/ml)を4個の10ml遠心管中での超遠心分離(4℃、43krpm、2時間)により小球化させた。各々のペレットを3mlの滅菌フィルター(0.22 $\mu\text{m}$ )したチオール化混合物(pH11.09、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>緩衝液(30ml)中のN-アセチルホモシステインチオラクトン塩酸塩(164mg)、エチレンジアミンテトラ酢酸二ナトリウム塩(255mg)及びジチオトレイトール(53mg)からなる)に再懸濁させた。この再懸濁ペレットをホモジナイズし(ダウンス)、合わせ、容器を脱気して窒素で被い、一晩(19時間室温で熟成させた。この溶液を3個の超遠心管に分け、1MKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を加え、蛋白質を小球化した(4℃、43Krpm、2時間)。このペレットを0.1Mりん酸ナトリウム、pH8緩衝液(30ml)に再懸濁させ、ホモジナイズし(ダウンス)、再小球化した(4℃、43Krpm、2時間)。この滅菌蛋白質ペレットを透過したPn6B-BuA<sub>2</sub>-BrAc溶液中での再懸濁に使用した。エルマン(Elman)試験をすぐに行い、SH価は34 $\mu\text{mol}$ を示した。この反応混合物を脱気して、窒素で被い、91時間室温で熟成させた。この蛋白質をpH8.0、0.1Mりん酸ナトリウム緩衝液5ml中のN-エチルマレイミド(75mg)からなる(0.22 $\mu\text{m}$ 滅菌フィルター)溶液1mlの添加によりキャップ化した。この混合物を室温で4時間熟成し、その後、N-アセチルシステアミン(0.22 $\mu\text{m}$ 滅菌フィルター化)300 $\mu\text{l}$ を添加し、この溶液を更に19.5時間熟成した。この滅菌キャップ化接合体を4個の遠心管に分け、0.1M、pH7りん酸ナトリウム緩衝液を加え、超遠心分離(4℃、43Krpm、2時間)により小球化した。次いで滅菌pH7、0.1M NaPO<sub>4</sub>緩衝液(42ml)中で再懸濁させ、ホモジナイズ(ダウンス)した。前記したような再遠心分離の後、このペレットを滅菌蒸留水全量50ml中ダウンスホモゲナイザーで再懸濁させた。4℃で17時間熟成後、接合調製物をTJ-6遠心機TH4ローターで1000rpm、3.5分間遠心分離して、少量の沈降物を除去した。この最終生成接合浮遊物を蛋白質(ローリー)、Pn6B-ポリサッカライド(フェノール/硫酸)、非接合ポリサッカライド(サイズ排除クロマトグラフィー-速度メフエロメトリー)及びアミノ酸(アミノ酸分析)に対して検定した。その結果は以下の様であった。

部分的に加水分解され、精製されたPn14-Psの調製

(1) 陰イオン交換樹脂での処理: Pn14-Ps粉末の2.81g部分を攪拌しながら室温で約4時間1124mlの蒸留水に可溶化させ、次いで4℃で一晩保存した。この溶液を蒸留水中約15時間予備膨張させたDE52(ワットマン、ジエチルアミノエチルセルローズ)pH約5-6、60gに加えた。このスラリーをブラットホームシェイカー上室温で約15時間優しく振動させた。その後、ベックマンJA-10ローターで5000rpm、20℃、15分間遠心分離した。更にこの上清を焼結ガラス漏斗(150ml、培地孔)に通して清涼化し2リッターのサイドアームフラスコに集めた。

(2) 超音波加水分解: DE52処理Pn14-Ps(容量1100ml、上記工程1から)を氷浴上プラスチックビーカー中ブランソン超音波機(1.5インチプローブ、8にセット)で2分間超音波をあてて分解させた。粘度を測定しながらこの試料を約15分間冷却し、次いで更に1分間隔で超音波をあてて分解した。最終超音波処理後には粘度の終点は1.096センチストロークに達した。この加水分解した試料を室温にし酢酸ナトリウム試薬(18.0g)を加えて最終濃度1%(w/v)にした。

(3) 血清学的プローブ: 試料10ml部分につき、イソプロパノール(IPA)分別予備研究及び抗体指示終点ネフェローゼ検定を行ったところ、Pn14-Psは35-45%IPAの間で浮遊することを示した。

(4) 第一IPA添加: 加水分解した試料(容量1090ml、上記工程2から)を706ml IPAの添加(室温で攪拌しながらの滴下)により39.3%IPAにした。この試料を15-30分間攪拌させ、次いで11000xgで30分間遠心分離(ベックマンJA-10ローター; 8000rpm; 20℃)し、上清を捨てた。この不毛のペレットを250mlオムニミックスジャー中無水エタノールで摩砕し、次いで60ml焼結ガラス漏斗上で集めた。この浮遊物を直接漏斗上で無水エタノール、次いでアセトンで洗浄し、CaCl<sub>2</sub>上室温で真空乾燥し分析用試料を調製した。

(5) 第二IPA添加及び産生物回収: 39.3%IPA上清液(容量1712ml、上記工程4から)を室温で攪拌しながら73.5ml IPA滴下により41.8%IPAにした。この試料を熟成し、上記工程4のように遠心分離した。このペレットを上記工程4のように摩砕、採集、洗浄、乾燥した。このPn14-Ps産生物は1399mgであった。

(6) 透析及び凍結乾燥: 上記工程5からの試料の一部分(1385.6mg)を554ml蒸留水中室温で2-3時間可溶化させた。この溶液(2.5mg/ml)を透析管(12000MW切断物; 45mm)に移し、蒸留水を2回変えながら蒸留水で27時間透析した。次

いでこの透析試料を凍結乾燥フラスコに移し、ドライアイス/メタノール浴で外側を凍結させ、乾燥するまで2-1/2日間バーチス(フリーズモービル)凍結乾燥機で凍結乾燥した。最終Pn14-Ps生成物の回収率は1326.8mgであり、Kdは0.56であった。この開示から、他の中性Pn-Psサブタイプ、例えばPn7F-Psはここで開示した方法によって調製することができ、また中性ポリサッカライドでもあるPn14-Psに関して接合できることは当業者にとって明らかであろう。

【0050】

【実施例5】

外膜蛋白複合体とニューモコッカル14多糖との結合  
Pn14-Ps-OMPC:

【0051】a. Pn14-Psの1,4-ブタンジアミン誘導体(Pn14-BuA<sub>2</sub>)の製造: P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で3時間真空下においたPn14-Psの410mgをジメチルスルホキシド(DMSO)26mlで被い、0.75時間攪拌して溶解した。これにカルボニルジイミダゾール62mgを加え、得られた溶液を室温にて80分間攪拌した。H<sub>2</sub>O 38.5ml中に1,4-ブタンジアミンジヒドロクロリド(BuA<sub>2</sub>·2HCl)

1.067gを含む溶液を調製し、そのpHを2.5NのNaOHで10.20に調節した。この溶液をMille x 0.2µmGVフィルターを通して濾過し、氷浴中で冷却した。上記熟成DMSO溶液を上記冷却BuA<sub>2</sub>溶液に加え、そのまま氷浴中でさらに10分間攪拌した。次いで、室温にて50分間静置し、その後に溶液を長さ12インチのSpectrapor 2透析チューブ2本に入れ、液面より1cm上をクリップでとめて、1) pH7.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液15リットルで16.5時間、2) pH7.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液15リットルで8時間、3) pH7.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液15リットルで8時間、4) H<sub>2</sub>O 15リットルで17.5時間透析を行った。次いで、これを凍結乾燥し、Pn14-Psの1,4-ブタンジアミン誘導体(Pn14-BuA<sub>2</sub>)210mgを得た。試料約5mgのNMRスペクトルは、多糖100繰返し単位当たり約31個のブタンジアミン残基が“負荷”されていることを示し、これはブタンジアミンメチレンおよび(Pn14-Ps)N-アセチルメチルの共鳴の積分値の比較によって特徴づけられた。

【0052】b. Pn14-Psのプロモアセチル化  
ブタンジアミン誘導体(Pn14-BuA<sub>2</sub>-BrAc)の製造: Pn14-BuA<sub>2</sub>(210mg)をpH9.0の0.1Mホウ酸塩-リン酸塩緩衝液36ミリリットルで被い、2.5時間攪拌して溶液を得た。次に、アセトニトリル4ミリリットル中p-ニトロフェニルプロモアセテート195mgを加えた。得られた混合物を4℃で21時間攪拌した。次いで、これをSpectrapor 2

チューブ中で、1) 蒸留水15リットルで6時間、2) 蒸留水15リットルで14.5時間、3) 蒸留水15リットルで6時間透析した。バッグの透析物から2.0ミリリットルを取って分析用に供し、次いで乾燥したpH8.0リン酸塩緩衝液492mg (pH8.0の0.1Mリン酸ナトリウムを凍結乾燥して調製)を加えた。溶液を2つの0.2 $\mu$ m Corning フィルターで濾過し、pH8.0のPn14-BuA<sub>2</sub>-BrAc水溶液(43ミリリットル)を得た。

【0053】c. OMPCのPn14-BuA<sub>2</sub>-BrAc-Psへの結合: OMPC (濃度3.2mg/ミリリットル)15ミリリットルを5本の10ミリリットル遠心チューブに入れ、Beckman 80 Tiローター中、43,000rpm (43K)、4℃にて2時間遠心した。Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>緩衝液(pH11.0)30ミリリットル中にEDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩)350mgおよびジチオトレイトール(DTT)64mgを溶解してチオール化混合物を得た。N-アセチルホモシステインチオラクトン346mgを加え、溶液を0.2 $\mu$ m Corning フィルター(カップ型)で濾過した。上記遠心からの各ペレットを濾過したチオール化混合物3ミリリットルでそれぞれ取り出し(全量15ミリリットル)、Dounce ホモジナイザーに移して再び懸濁させた。チューブにはチオール化溶液をさらに5ミリリットル用いて順に移すことにより洗浄した。この洗浄工程をさらに5ミリリットルのチオール化溶液を用いて繰り返した。合わせた洗浄液はDounce に入れてホモジナイズし、再懸濁物(25ミリリットル)を全量100ミリリットル丸底フラスコに移した。隔膜でシールし、Firestoneバルブを用いて空気をN<sub>2</sub>で置換した後、反応混合物を21時間静置した。次いで、反応混合物25ミリリットルを3本の遠心チューブに分け、それぞれの上に1MのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(水溶液)を入れて43Krpmおよび4℃にて2時間遠心した。上澄液を除去し、ペレットをpH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液に再\*

\*懸濁した(再懸濁液の最終体積は全量で30ミリリットル)。次ぎに、第2の超遠心(2時間、4℃、43Krpm)を行った。上澄液を除去した後、ペレットを上記で調製した濾過されたPn14-BuA<sub>2</sub>-BrAc溶液中にDounce 法により再懸濁した。この時点でのEllman 検定は全部で23マイクロモルのチオールを示した。Pn14-BuA<sub>2</sub>-BrAc溶液の濾過はチオール化蛋白質の再懸濁の直前に行うことに注意する必要がある。生じた反応(すなわちPn14-BuA<sub>2</sub>-BrAcとチオール化OMPCとの反応)はN<sub>2</sub>箱中で(脱気して)N<sub>2</sub>下、室温にて114時間静置した。次いで反応を次のようにして封止(cap)した(すなわちPn14-PsおよびOMPC上の反応部位を不活化する)。pH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液5mL中にN-エチルマレイミド(NEM)75mgを含む溶液を0.22 $\mu$ mフィルターで濾過し、その1mLを上記反応混合物に加えて4時間静置した。次に、0.22 $\mu$ m フィルター(Millex GV)で濾過したN-アセチルシステアミン溶液(pH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液2.1mL中に900 $\mu$ Lを溶解したもの)1mLを加え、混合物をさらに22.5時間静置した。封止した反応混合物(35ミリリットル)を4本の遠心チューブに分けて遠心した(43K、2時間、4℃)。ペレットを40ミリリットルTED緩衝液(0.1Mトリス、0.01M EDTA、0.5%DOC、pH8.5)中に再懸濁させ、室温にて19時間静置した。次いで、溶液を遠心した(43K、2時間、4℃)。ペレットをpH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液40ミリリットルに再懸濁し、その後再び遠心した(43K、2時間、4℃)。これらのペレットを蒸留水44ミリリットル中に再懸濁し、4℃にて17時間静置した。低速遠心(1000rpm、3.5分)で小さなペレットが得られ、これを捨てた。上澄液を除去するとバルクの結合体が43ミリリットル得られ、これは次のような分析特性を有していた。

試 験	結 果
a. Ps含量	387mcg/mL
b. 蛋白質	1300mcg/mL
Ps/蛋白質比(計算値)	0.30
c. 遊離Ps	<5面積%
d. アミノ酸分析	
SCMHC/リシン	9.8 %
SCMC/リシン	3.5 %

【0054】

【実施例6】

部分加水分解して精製されたPn23F-Psの製造:

(1) 超音波加水分解: Pn23F-Ps粉末の3.0gを室温で約4時間攪拌して食塩水(0.9%NaCl)1200mLに溶解した。次いで溶液を氷浴中のブラスタックピーカー内でBranson Sonifier (1.5I※50

※ンチプローブ、設定8)を用いて3分間隔で合計15分間超音波処理した。各間隔ごとに粘度をチェックした。

15分間の後、さらに5分間超音波処理を行って最終粘度1.206センチストークスを得た。加水分解した試料を室温に戻し、酢酸ナトリウム試薬(58.4g)を最終濃度3%(w/v)まで加えた。

(2) 血清学的プローブ: イソプロパノール(IPA)

## 31

分別試験および抗体指示終点Nephelose検定 (antibody-directed end-point Nephelose assay) を試料の10 mLについて行い、Pn23-Psは35~45%IPAで沈殿することが示された。

(3) 第1のIPA添加: 加水分解した試料〔体積=1165 mL、上記工程(1)からのもの〕にIPA810 mLを加えて(室温にて攪拌しながら滴下)41.0%IPAとした。試料を15~30分間攪拌し、次いで11,000×gで30分間遠心した(Beckman JA-10ローター; 8,000 rpm; 20℃)。排出ペレットを250 mLのOmnimixer中にて無水エタノールで摩砕し、次いで60 mL焼結ガラスファネル上に捕集した。この沈殿を直接ファネル上にて無水エタノール、次いでアセトンで洗浄し、室温にてCaCl<sub>2</sub>上で減圧乾燥して分析用に供した。

(4) 第2のIPA添加および生成物の回収: 上記の41.0%IPA上澄液〔体積=1925 mL、上記工程(3)からのもの〕に室温で攪拌しながらIPA85.0 mLを滴下して43.5%IPAとした。工程(3)と同様にして試料を攪拌し遠心した。さらに工程(3)と同様にしてペレットを摩砕し、捕集し、洗浄し、乾燥した。Pn23F-Ps生成物は1795 mgであった。

(5) 透析および凍結乾燥: 上記工程(4)からのPs試料15111-39-2の一部(1779 mg)を室温にて3~4時間かけて蒸留水712 mLに溶解した。溶液(2.5 mg/mL)を透析チューブ(分画分試料12,000; 45 mm)に移し、4℃にて27時間蒸留水で透析した。この間に蒸留水は2回交換した。次いで試料を凍結乾燥フラスコに移し、ドライアイス: メタノール浴中でシェル凍結し、Virtis (Freezemobile) 凍結乾燥器上で2~3日凍結乾燥した。最終Ps生成物の回収量は1703 mgであった。最終生成物はK<sub>d</sub>=0.60を有していた。

【0055】

【実施例7】

外膜蛋白質複合体とPn23F-Psとの結合

【0056】a. Dowex 50×2 (200-400メッシュ) テトラブチルアンモニウム樹脂〔Dowex 50 (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)〕の製造: H<sup>+</sup>形のDowex 50×2 (200-400メッシュ) 72 gを水でスラリーとし(この過程で用いた水はすべてバイロジェンフリーの無菌蒸留水である)、カラムに充填し、順に1) H<sub>2</sub>O 800 mL、2) 6N HCl 400 mL、3) H<sub>2</sub>O 300 mL (流出液がpH試験紙で中性になるまで)、4) 10%水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液(流出液がpH試験紙で強アルカリ性になるまで)、5) H<sub>2</sub>O 750 mLで洗浄した。

【0057】b. Pn23F-Psテトラブチルアンモニウム形〔Pn23F (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)〕の製造: Do

## 32

wex 50×2 (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) の34 mLカラムをH<sub>2</sub>O 70 mLで洗浄した。サイズをそろえたPn23F-Psの450 mgをH<sub>2</sub>O 50 mLで被い、0.5時間攪拌した。この溶液をカラムに加え、重力で通過させた(約2時間)。ここで真空をカラムの底にかけて、さらに1時間(真空下で)流出を続けた。カラムをH<sub>2</sub>O 25 mLで洗浄し、合わせた流出液を凍結乾燥して、Pn23F (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) 塩0.5 gを得た。これを真空デシケター中P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で約17時間保存した。

10 【0058】c. Pn23F-Psの1,4-ブタンジアミン誘導体(Pn23F-BuA<sub>2</sub>)の製造: 上記工程bからのPn23F (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) 0.5 gをジメチルスルホキシド(DMSO) 25 mLで被い、15分間攪拌して溶解した。これにカルボニルジミダゾール(CDI) 22 mgを加え、得られた液を室温で0.5時間攪拌した。H<sub>2</sub>O 32 mL中に1,4-ブタンジアミンジヒドロクロリド(BuA<sub>2</sub>·2HCl) 507 mgを含む溶液を調製し、pHを2.5N NaOHで10.23に調節した。この溶液をMillex 0.2 μm GVフィルターで濾過し、氷浴中で冷却した。静置しておいた上記DMSO溶液を冷BuA<sub>2</sub>溶液に加え、さらに1時間氷浴中で攪拌した。次いでこれを室温で1時間静置した後、溶液を12インチのSpectrapor 透析チューブ2本に入れ、液面から上に1 cmのところをクリップでとめて、1) pH 7.0の0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液15 Lで16時間、2) pH 7.0の0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液15 Lで10.5時間、3) pH 7.0の0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液で12.5時間、4) H<sub>2</sub>O 15 Lで10.5時間の順に透析を行った。次いでこれを凍結乾燥してPn23F-Psの1,4-ブタンジアミン誘導体(Pn23F-BuA<sub>2</sub>) 220 mgを得た。約6.9 mgのNMRスペクトルは多糖100繰り返し単位当たり約23.5個のブタンジアミン残基の“負荷”をしめし、これはブタンジアミンメチレンおよび(Pn23Fの)ラムノースメチルの共鳴の積分値の比較により特徴づけられた。

40 【0059】d. Pn23F-Psのプロモアセチル化ブタンジアミン誘導体(Pn23F-BuA<sub>2</sub>-BrAc)の製造: Pn23F-BuA<sub>2</sub>-(214 mg)をpH 9.0の0.1 Mホウ酸塩-リン酸塩緩衝液23 mLで被い、30分間攪拌して溶液を得た。次に、アセトニトリル6 mL中のp-ニトロフェニルプロモアセテート230 mgを加えた。得られた混合物を4℃で23時間攪拌した。次いで、Spectrapor 2チューブ内で、1) H<sub>2</sub>O 15 Lで8時間、2) H<sub>2</sub>O 15 Lで12時間、3) H<sub>2</sub>O 15 Lで6時間透析した。透析後のバッグ内容物から1.5 mLを評価用にとっておき、pH 8.0のリン酸塩緩衝塩乾燥物(pH 8.0の0.1 Mリン酸ナトリウム溶液を凍結乾燥して調製) 490 mgを加えた。溶解には約15分間を要し、その後0.2 μm

33

Corning フィルターで濾過してpH8.0のPn23F-BuA<sub>2</sub>-BrAc水溶液を得た。

【0060】e. OMPCとPn23F-BuA<sub>2</sub>-BrAc-*Ps*との結合: OMPC (3.1mg/mL) 60mLを10mL遠心チューブ6本に入れ、Beckman 80Tiローター中にて43,000rpm (43K)、4℃で2時間遠心した。EDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩) 260mgおよびジチオトレイトール (DTT) 52mgをNa<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 緩衝液30mLに溶解してチオール化混合物を調製し、チオラクトンを加えた後に溶液を0.2μm Corning フィルター (カップ型) で濾過した。上記遠心からの各ペレットを濾過したチオール化混合物3mLを用いてそれぞれ取り出し (全量20mL)、Dounce ホモジナイザーに移して再懸濁した。各チューブにさらに6mLのチオール化溶液を順に移動させてそれらを洗浄した。この洗浄法をさらに4mLのチオール化溶液を用いて繰り返した。合わせた洗浄物をDounce でホモジナイズし、再懸濁物の全量 (28mL) を100mL丸底フラスコに移した。隔膜でシールし、Firestone バルブを用いて空気をN<sub>2</sub>で置換した後、反応混合物を19時間静置した。この反応混合物28mLを3本の遠心チューブに分け、それぞれの上に1Mリン酸カリウム (水溶液) を加えて、Beckman 80Tiローター中、43Krpmおよび4℃で2時間遠心した。上澄液を除去し、ペレットをpH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液に再懸濁した (最終再懸濁物の全量は30mL)。第2の超遠心 (2時間、4℃、43Krpm) を次に行った。上澄液を除去した後、Dounce 法によりペレットを濾過したPn23F-BuA<sub>2</sub>-BrAc溶液 (7.1. C. 3d で調整したもの) 中に再懸濁した。この時点でのEllman 検定は、得られた溶液中に全部で約28マイクロモルのチオールが存在することを示した。Pn23F-Bu\*

#### 試 験

- a. *Ps* 含量
- b. 蛋白質  
*Ps*/蛋白質 (計算値)
- c. 遊離 *Ps*
- d. アミノ酸分析  
SCMHC/リシン  
SCMC/リシン

【0061】

#### 【実施例8】

Gaulin ホモジナイゼーションによるPn-*Ps*の製造: 粗ニューモコッカル粉末を水中1.5mg/mL濃度で4℃にて一晩混合することにより溶解した。より濃縮したPn-*Ps*溶液も10mg/mLで調整した。50mM CaCl<sub>2</sub>の添加により、10mg/mL溶液の粘度を1.5mg/mL溶液の粘度まで有効に低下させることができた。次いで、溶解したPn-*Ps*を、4※50

34

\* A<sub>2</sub>-BrAc溶液の濾過はチオール化蛋白の再懸濁の直前に行っている点に注意されたい。生ずる反応 (すなわちPn23F-BuA<sub>2</sub>-BrAcとチオール化OMP Cとの反応) はN<sub>2</sub>ボックス内、N<sub>2</sub>下 (脱気)、室温にて117時間エージングした。次いで反応を以下のように封止した (すなわちPn23F-*Ps*およびOMP C上の反応部位を不活性化する)。pH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液5mL中にN-エチルマレイミド (NEM) 75mgを含む溶液を0.22μmフィルターで濾過し、反応物に加え、18時間エージングした。封止した結合体混合物の全量は38.5mLであり、pH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液1.5mLを加えて全量を40mLとした。この溶液35mLを10mL遠心チューブ4本に均等に入れ、それぞれの上にpH8.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液を加えた。これらを43Krpm、2時間、4℃で遠心した。上澄液を除去し、各ペレットをTED緩衝液 (1Mトリス、pH8.5、0.01M EDTA、0.5% Naデオキシコレート) 8mLで取り出し、Dounce ホモジナイザーに移した。遠心チューブをさらに8mLのTED緩衝液で順に洗浄し、ペレットを再懸濁させて (全量40mL)、室温にて20時間静置した。静置したものを10mLチューブ4本に入れ、43K、2時間、4℃で (上記と同様に) 遠心した。上記と同様にして、各ペレットをTED緩衝液8mLで取り出し、チューブをTED緩衝液8mLで順に洗浄し、再懸濁し、遠心した。これらのペレットをpH7.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液全量40mLに再懸濁し、上記のように遠心した。得られたペレットを水全量44mLに再懸濁し、4℃で17時間静置した。少量の不溶物を低速遠心 (1000rpm、35分) で除去して上澄液中に生成物を得た。得られた上澄液が薬物のバルク結合体ワクチンである。この結合体は次のような分析特性を有していた。

#### 結 果

284mcg/mL
2025mcg/mL
0.14
<5面積%
6.7 %
1.6 %

※種類の圧力設定2000、5000、10000あるいは15000PSIのうちの1つに設定されたGaulin ホモジナイザーに通した。剪断されたPn-*Ps*を60%イソプロパノールの添加により捕集し、CaCl<sub>2</sub> (2Mストックからのもの) 中50mMとした。ペレットをオムニミキサー中100%エタノールで洗浄し、濾過して沈殿したPn-*Ps*を回収した。Pn-*Ps*はフィルター上にてアセトンで洗浄し、CaSO<sub>4</sub> (ドライヤライト) 上で乾燥し、分析するまで-70℃で保存し

35

36

た。剪断されたPn-Psを少量ずつ分取して約1mg/mLで再懸濁させ、分子サイズおよび多分散度についてはHPSEC-ユニバーサルキャリブレーション、抗\*

\*原性指数についてはレート比濁法(rate nephelometry)で分析した。

Pn-Ps サブタイプ	抗原性が低下 し始めるMW	多分散度
6B	500,000	1.19
14	300,000	1.15
19F	250,000	1.09
23F	250,000	1.15

【0062】

【実施例9】

マウスT細胞刺激：この試験は、Pn-Ps結合体ワクチンのマウスにおけるT細胞依存性/T免疫原性を確立するために行った。このモデルを採用したのは、2歳未満の子供はT依存性抗原に通常よく応答するからである。無胸腺マウスは異常な胸腺上皮を有し、それゆえT依存性抗原に対するそれらの応答は、正常な同属同腹子よりも著しく低い。ワクチンを1回で希釈して多糖の投与量0.5μgとしたものを、アダルト無胸腺マウス群(nn/nn)およびそれらの同属対照同腹子群(nn/+)

10※た試料はベータカウンターで1分間計数する。ワクチンに対する免疫原性応答は、もし試験動物の少なくとも50%が2回のワクチンの投与を受けた後に少なくとも1μg抗体応答を有すれば満足できるものである。Pn6B-Ps-OMPC、Pn23F-Ps-OMPC、Pn19F-Ps-OMPCおよびPn14-Ps-OMPCは、強い抗型特異性抗体応答をひき起こすことがわかった。加えて、Pn6B-Ps-OMPC、Pn23F-Ps-OMPC、Pn19F-Ps-OMPCおよびPn14-Ps-OMPCから成る4価組成物は、4種の血清型すべてに対して良好な抗Pn-Ps抗体応答を示した。

【0064】

【実施例11】

チンチラにおけるニューモコッカ結合体の保護的効果：各チンチラに対し、Al(OH)<sub>3</sub>に吸着させた0μg、0.25μg、1.0μgまたは4.0μgのPn6B-Ps-OMPCを皮下もしくは筋肉内注射した。チンチラは0週目、2週目、4週目、6週目および8週目に採血した。注射の8週間後にこれらの動物に対してストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*) 6Bを攻撃させ、検耳法(otoscopy)と鼓室測定(tympanometry)で1~3日ごとにモニターした。中耳浸出液を吸引して培養し、攻撃2週間後に動物を殺した。殺した動物について中耳の組織病理分析を行った。結合体を受けていない動物の致死率は60%であったのに対し、最低投与量の場合でも致死率は0%であった。結合体を受けていない動物における化膿性中耳炎に対しては保護はなかったのに対し、結合体を受けたものはすべての投与範囲にわたって60ないし100%の水準で保護された。

【0065】

【実施例12】

2~5歳の子供における抗ニューモコッカ免疫応答Pn6B-Psを0.5μgまたは5μgずつ2回投与した2~5歳の子供について、RIAおよびELISAにより抗Pn6B-Ps抗体の産生を調べた。抗Pn6B-Ps抗体の著しい上昇が観察された。

【0066】

【実施例13】

ニューモコッカ多糖のレート比濁測定

【0063】

【実施例10】

アカゲザル幼獣におけるPn-Ps結合体の免疫原性：この試験は、Pn-Ps-OMPCまたはPn-Ps-MIEP結合体ワクチンのバルク結合体または容器充填物の幼猿における免疫原性を確立するために行う。この幼猿モデルはPedvax HIB(商標)結合体ワクチンのためのすぐれた臨床予測試料であることが示されており〔Vellaら、Pediatrics(小児科学)、4月5日補、668-675頁(1990年)〕、そのためPn-Ps結合体ワクチンの評価のためのモデルとして選ばれたものである。投与量のワクチンを月令2箇月ないし3箇月の幼猿に0日目および28日目に筋肉内注射する(0.25mLずつ2箇所)。猿は0日目、28日目および42日目に採血し、それぞれの血清についてラジオイムノアッセイ(RIA)で抗体応答を調べる。RIAにおいて、それぞれの猿血清はC<sup>14</sup>で標識したPn-Psと合わせる。生成した抗原抗体複合体は、次いで飽和硫酸アンモニウムを加えて沈殿させる。それぞれ処理し※50



37

この検定の目的は、遊離Pn-Psおよび結合体調製物の多糖含量および抗原性指数を、レート比濁法を用いて測定することである。レート比濁法の標準曲線の範囲は、単位Pn-Ps質量当りの応答として種々のPn-Psについて異なり、またPn-Ps抗原濃度プロフィールに対する応答の直線部分はそれぞれのPn-Psについて異なる。ここに例示する手法はPn6B結合体についてのものであり、他のPn-Ps型結合体には必ずしも適用できるわけではない。また、アルミに吸着した試料およびそれらについての各標準物は、以下に示すよう

#### 【0067】A) 試薬

食塩水：0.9%NaCl水溶液

抗Pn-Ps血清：抗血清（Health Research, Inc., Albany, NY）を食塩水で30倍に希釈する。

標準物：1.0、1.5、2.0、2.5、3.0および4.0mcg/mLのPn-Ps結合体標準物を387μg/mLのストック溶液から調製する。ストック溶液の濃度は多糖に対するフェノール硫酸検定で測定した。

試験用試料：クエン酸ナトリウムストック液においてクエン酸ナトリウムの濃度が最終的に3%となるように調製し、試験用試料の順に希釈して1.0、2.0および3.0mcg/mLのPn-Ps理論濃度とする。

#### 【0068】B) 操作

すべての試料および標準物をBeckman ICSレート比濁計を用いて重複測定により検定する。標準曲線から試料中の濃度を定める。試料濃度に希釈率を乗じ、各試料について値を平均する。上記したように、この方法で抗原性指数が70%より低いとわかったものは結合体形成から除外し、用いられるPn-Psが所望の免疫学的特性を有するようにする。

#### 【0069】

#### 【実施例14】

ナイセリア メニンジチディスB11抗原型 2 OMPCの調製

#### A. 醗酵

【0070】1. ナイセリア メニンジチディスグループB11

ナイセリア メニンジチディスの凍結乾燥培養物を含む管（ドクター エムアーテンシュタイン（Dr. M. Arntstein）、ワルター リード アーミー インスティテュート オブ リサーチ（Walter Reed Army Institute of Research（WRAIR）、ワシントンD.C.）を開封し、ユーゴンブロス（Eugonbroth（BBL））を添加した。培養物をミュエラーヒントン（MuellerHinton）

38

寒天の斜面に画線培養し、5%CO<sub>2</sub>下37℃で36時間インキュベートし、この時に、この増殖物を10%スキムミルク培地（Difco）中へ採取し、一部分を-70℃で凍結した。この微生物の同定はWRAIRにより提供される特異的抗血清との凝集及びDifcoにより提供される血清の型を検査することにより確認した。第2通路からの培養物のビンを解凍しコロンビア羊血寒天プレート（CBAB-BBL）上に画線培養した。このプレートを5%CO<sub>2</sub>下37℃で18時間インキュベートし、この後、この増殖物を10%スキムミルク培地100ml中へ採取し、一部分を0.5ml量取り-70℃で凍結した。この微生物は特異的抗血清との凝集、糖化発酵及びグラム染色によりプラスであると同定した。この通路からの培養物のビンを解凍し、ミュエラーヒントンブロスで希釈し40ミュエラーヒントン寒天プレート上に画線培養した。このプレートを6%CO<sub>2</sub>下37℃で18時間インキュベートし、この後、この増殖物を10%スキムミルク培地17ml中へ採取し、一部分を0.3ml量取り-70℃で凍結した。この微生物はグラム染色、特異的抗血清との凝集及びオキシダーゼ試験によりプラスであると同定した。

#### 【0071】2. 発酵及び細胞ペーストの採集

a. 接種原発育 接種原をナイセリア メニンジチディスグループB、上記からのB-11（通路4）の一つの凍結ビンから発育させた。10個のミュエラーヒントン寒天斜面に接種し、約18時間後に6個を採集し、pH6.35のゴットシュリッヒ酵母透析培地の3×250mlフラスコに対する接種原として使用した。OD<sub>660</sub>を0.18に調整しOD<sub>660</sub>が1~1.8の間になるまでインキュベートした。この培養物1mlを5×2リッター、エルレンメイヤーフラスコ（各々1リッターの培養液を含む；下記参照）の接種に使用し振盪機中200rpm、37℃でインキュベートした。このO.D.を接種後一時間毎にモニターした。4リッターのプロス培養物は、OD<sub>660</sub>が1.28であった。

#### 70リッター種子発酵槽

約4リッターの種子培養物を約40リッターの完全産生培地（下記参照）を含む滅菌70リッター発酵槽の接種に使用した。70リッター発酵の条件は、37℃、毎分10リッターでの空気散布185rpm、pH約7.0の一定pH下、約2時間であった。このバッチに対する最終OD<sub>660</sub>は2時間後で0.732であった。

#### 800リッター産生発酵槽

約40リッターの種子培養物を568.2リッターの完全産生培地（下記参照）を含む滅菌800リッター発酵槽の接種に使用した。このバッチを、37℃、毎分60リッターでの空気散布100rpm、pH7.0の一定pH下でインキュベートした。このバッチに対する最終ODは接種後13時間で5.58であった。

【0072】3. エルレンメイヤーフラスコ、70-及

び800-リッター発酵槽に対する完全培地

画 分 A	g/リッター
L-グルタミン酸	1.5
NaCl	6.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水)	2.5
NH <sub>4</sub> Cl	1.25
KCl	0.09
L-システインHCl	0.02

画分B (ゴットシュリッヒ酵母透析物)

1280gのディフコ酵母エキスを6.4リッターの蒸留水に溶解した。この溶液を3個のH10SMカートリッジを有する2アミコンDC-30ホローファイバー透析機で透析した。384gMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O及び3200gデキストロースをこの透析物に溶解させ、全容量を蒸留水で15リッターにした。このpHをNaOHで7.4に調整し、0.22μmフィルターに通過させて滅菌し、画分Aを含む発酵槽に移した。

エルレンメイヤーフラスコ：1リッターの画分A及び25mlの画分Bを添加し、このpHをNaOHで7.0〜7.2に調整した。

70リッター発酵槽：41.8リッターの画分A及び900mlの画分Bを添加し、このpHをNaOHで7.0〜7.2に調整した。

800リッター発酵槽：553リッターの画分A及び15.0リッターの画分Bを添加し、このpHをNaOHで7.1〜7.2に調整した。

b. 採取及び不活性化

発酵終了後、フェノールを別の容器に添加し、そこへ細胞ブロスを移し、最終フェノール濃度を約0.5%にした。培養物がもはや生育しなくなるまで(約24時間)この物質を弱く攪拌しながら室温に保持した。

e. 遠心分離

4℃で約24時間後、614.4リッターの不活性培養液をシャープレス継続流動遠心機で遠心分離した。フェノール処理後の細胞ペーストの重量は3.875kgであった。更にフェノールで中和した発酵ブロスは以下に記載する透析処理により採取した。

【0073】B. OMPC分離

工程1. 濃縮及び透析処理

フェノールで不活性化した培養物を約30リッターに濃縮し0.2μmホローファイバーフィルター(ENKA)を使用して滅菌蒸留水で透析処理を行った。

工程2. 抽出

等量の2X TED緩衝液(0.1M トリス、0.01M EDTA緩衝液、pH8.5、0.5%ナトリウムデオキシコレート)を濃縮した透析処理細胞に添加した。この懸濁物をOMPC抽出用の温度制御したタン\*50

\*クに56℃で攪拌しながら30分にわたり移した。この抽出物をシャープレス継続流動遠心機で流速約80ml/分、約4℃、約18000rpmで遠心分離した。次いで、粘性の上清液を集め4℃で保存した。この抽出した細胞ペレットを前記したようにTED緩衝液で再抽出した。上清液を合わせ4℃で保存した。

工程3. 限外濾過による濃縮

合わせた抽出物をAG-Tech0.1μmポリスルホンフィルターに取り付けた温度制御した容器に移した。抽出物の温度は濃縮工程において容器中25℃に保った。この試料を平均膜内外圧11〜24psiの間で10倍濃縮した。

工程4. OMPCの採集及び洗浄

工程3からの保有物を流速300〜500ml/分の間で継続流動遠心機で約160000xg(35000rpm)、約70℃で遠心分離し上清液を捨てた。このOMPCペレットをTED緩衝液(190ml緩衝液; 20ml/gペレット)に懸濁させ、工程2及び工程4を2回繰り返した(工程3省略)。

工程5. OMPC産生物の回収

工程4からの洗浄したペレットを100ml蒸留水に懸濁させガラス棒及びダウンスホモゲナイザー(Dounce homogenizer)で完全な懸濁物とした。次いでこの水性OMPC浮遊物を0.22μmフィルターを通過させることによりフィルター滅菌し、0.1μmホローファイバーフィルターを使用して滅菌蒸留水にさらす透析処理によってTED緩衝液を水で置換した。

【0074】

40 【実施例15】

OMPCのサブユニットの精製

ポリアクリルアミドゲルによるOMPCあるいはリコンビナント細胞からの精製MIEPの調製

アクリルアミド/BIS(37.5:1)ゲル、18×14cm、3mm厚を使用した。スタッキングゲルは4%ポリアクリルアミドであり、分離ゲルは12%ポリアクリルアミドであった。約5μgのOMPC蛋白あるいはリコンビナント宿主細胞蛋白をゲル当り使用した。1mlのOMPCに試料緩衝液(4%グリセロール、300mM DTT、100mMトリス、0.001%プロモ

## 41

フェノールブルー、pH7.0) 0.5mlを添加した。この混合物を20分間105℃に加熱し、ゲルに載せる前に室温に冷却した。ブロモフェノールブルーがゲルの底部に到達するまで、冷却しながら200~400ミリアンプでゲルを作動させた。ゲルの垂直片を切り出し(約1~2cm幅)コマッシー/酢酸銅(0.1%)で染色した。MIEPバンド(約38KD)が見えるまでその切片から汚れを取り除いた。次いでその切片を元のゲル位置に置きMIEP領域をゲルの残部からメスで摘出した。この摘出領域を正方形に切り(約5mm)、0.01Mトリス緩衝液、pH8.1で溶出させた。溶出の2サイクル後、溶出物の純度をSDS-PAGEで評価した。この溶出物を溶出物の共通プールと合わせ48時間60mMアンモニア-蟻酸、pH10で透析した。別法として、溶出した蛋白は水中の50%酢酸で透析することができる。透析後溶出した蛋白を蒸発乾固した。この物質をPD10サイズカラム(ファルマシア、ビスキャウエイ、ニュージャージー州)に通過させて更に精製し、室温で保存した。

【0075】

【実施例16】

Pn-Ps調製物中のC-ポリサッカライド含有量の定量測定

NMR、酵素又はクロマトグラフによる方法に基づいていくつかのシステムがC-ポリサッカライドの定量のために開発されている。この場合においては、加水分解されたPn-Psのサンプルからの塩素(C-Psの成分)のクロマトグラフ分離を利用し、これらの他の方法と比較した。塩素を下位伝導度検出(suppressed conductivity detection)と 組合せたカチオン交換カラムに\*

サンプル	NMR	酵素	HPLC
Pn6B-Ps	20%	N. D.	18.4%
Pn6B-Ps	1.6%	0.3-1.0%	1.2%
Pn23F-Ps	N. D.	2.8%	3.7%
Pn14-Ps	2.9%	2.4%	3.2%
Pn19F-Ps	2.7%	2.6%	2.6%

【0076】

【実施例17】

MIEPをコードするゲノムDNAのクローニング  
フェノールで不活性化したN. メニンギチジス(meningitidis)細胞(実施例1参照)を約0.1g新しいチューブにとる。このフェノールで不活性化した細胞をTE緩衝液[10mM TRIS-HCl, 1mM EDTA, pH8.0] 567μLに再懸濁する。この再懸濁した細胞群に10%SDSを30μL、および20mg/mLのプロテイナーゼK(Sigma)を3μL加えた。細胞群を混合し、37℃で約1時間培養した後、5M NaClを100μL加えて十分に混合した。次いで0.7M NaCl中の1%臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)を80μL加えて十分に混合し、65

## 42

\*において分離した。Pn-Psのサンプルを、45~65℃で2時間36%フッ化水素酸で処理した後、100℃で16時間2Mトリフルオロ酢酸で処理することによって完全に加水分解する。加水分解に次いで、200~300μgのサンプルをDionex BioLCクロマトグラフィシステムに注入した。このシステムは Omnipac PCX-500分析及びガードカラム、Ion Pac CTC-1カチオントラップカラム、CMMS-2マイクロメンブラン サプレッサー(50mMテトラブチルアンモニウムハイドロオキシド(10ml/min)で再生された)、及び1μジーメン(Siemens)の感度にセットされた伝導度検出計を持っている。5%200mM HCl、5%20%アセトニトリル、85% Milli Q water(逆浸透水)、5%20mMジアミノプロピオン酸を平等に使用してサンプルを溶出した。塩素は、約10分後にシャープなピークとして溶出した。精製C-Ps(Statens Serum Institutから得られた)を、この方法を使用して塩素含有量について分析し、5.4重量%塩素の値を得た。この値はC-Psの塩素含有量の公表された報告と一致している。このファクターを使用して、HPLCによって得られた塩素のナノモル量を質量値に換えることによってPn-Ps調製物の種々のサンプル中のC-Ps濃度を計算した。重量で5.4%塩素の変換を利用して、C-Psの質量を重量で計算した。3%を越えるC-Ps濃度を有するサンプルは結合のために許容できないので排除した。次の表はNMR及び酵素による方法とこの方法の相互関係を示し、そして純度が増加するPn-Ps調製物の典型的なC-Ps汚染水準を示す。

※℃で10分間培養した。等体積(約0.7~0.8mL)のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を加えて十分に混合し、約10,000xgで約5分間遠心した。水性相(上層)を新しいチューブに移し、有機相を廃棄した。等体積のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)を上記水性相に加えて十分に混合し、10,000xgで約5分間遠心した。水性相(上層)を新しいチューブに移し、0.6体積(約420μL)のイソプロピルアルコールを加えて十分に混合し、沈殿したDNAを10,000xgで10分間遠心した。上澄液を廃棄し、ペレットを70%エタノールで洗浄した。このDNAペレットを乾燥し、TE緩衝液100μLに再懸濁した。これはN. メニンギチジス(meningitidis)のゲノムDNAである。

43

44

MIEP遺伝子の5'末端およびMIEP遺伝子の3'末端に対応する2つのDNAオリゴヌクレオチドを合成した〔Murakami, E. C. ら、(1989)、Infection \*

\*and Immunity (感染と免疫)、57、2318-23頁〕。MIEP遺伝子の5'末端に特徴的なDNAオリゴヌクレオチドの配列は、

5' -ACTAGTTGCAATGAAAAATCCCTG-3'

であり、MIEP遺伝子の3'末端に特徴的な配列は、

5' -GAATTCAGATTAGGAATTTGTT-3'

であった。これらのDNAオリゴヌクレオチドを、10ナノグラムのN. メニンギチジス (meningitidis) のゲノムDNAを用いるMIEP遺伝子のポリメラーゼ鎖伸長反応 (PCR) 増幅のためのプライマーとして用いた。PCR増幅工程はメーカー (Perkin Elmer) による操作手順に従って行った。増幅したMIEP DNAを次に制限酵素Spe IおよびEcoRIで消化した。MIEPを完全にコードする領域を含む1.3キロベース (kb) DNA断片を1.5%アガロースゲル上の電気泳動で単離し、電気溶出 (electroelution) でゲルから回収した〔Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学における最近の方法)、(1987)、Ausubel, R. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D., Smith, J.A., Seidman, J. G. および Struhl, K 著、Greene Publishing Assoc.〕。プラスミドベクターpUC-19をSpe IおよびEcoRIで消化した。ゲル精製したSpe I-EcoRI MIEP DNAをSpe I-EcoRI pUC-19ベクターに連結し、これを用いてE. coli (coli) DH5株の形質転換を行った。pUC-19ベクターと1.3kb MIEP DNAを含む形質変換体は制限酵素地図により同定し、MIEP DNAの配列決定によりその同一性を保証した。

【0077】

【実施例18】

pC1/1. Gal 10p (B) ADH1tベクターの構成

※

5' -AGCTCGGATCCG-3'

3' -GCCTAGGCTCGA-5'

得られたプラスミドpGal 10 (B) tADH1はHind IIIサイトが除去され、唯一のBamHIクロニングサイトを生じた。そのGal 10p.tADH1断片を、Sma I及びSph Iでの切断によってpGal 10 (B) tADH1から分離し、T4 DNAポリメラーゼでプラントエンドにし、そしてゲル精製した。酵母シャトルベクターpC1/1〔Brake等、(1984)、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、第81巻、4642~4646ページ〕をSph Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼでプラントエンドにし、そして精製した。この断片をT4 DNAリガーゼでベクターに結合した。次に、この接合反応混合物を使用してE. coli HB101細胞をアンピシリン耐性に形質転換し、形質転換体を、<sup>32</sup>PでラベルしたHind III-BamHIリンカーの一本鎖へのハイブリット形成によ

※Gal 10プロモーターを、San 3A及びHind IIIでの切断後に得られた0.5キロ塩基対 (kbp) をゲル精製することによってプラスミドp52〔Broach等、(1983) 遺伝子発現の実験操作 (Experimental Manipulation of Gene Expression, イノウエ (Inouye)、M (Ed) Academic Press 83~117ページ〕から分離した。ADH1ターミネーターを、Hind III及びSpe Iでの切断によって得られた0.35kb断片をゲル精製することによってベクターpGAP.tADH2〔Kniskern等、(1986)、遺伝子、第46巻、135~141ページ〕から分離した。2つの断片を、親ベクターpGal 10-tADH1を造るためにBamHI及びSph Iで切断されたゲル精製pUC18ΔHind IIIベクター (Hind IIIでpUC18を消化し、E. coli DNAポリメラーゼIのクレノウ断片でプラントエンドにし、そしてT4 DNAリガーゼで結合することによって、Hind IIIサイトを除去した) に T4 DNAリガーゼで結合した。これは、Gal 10p. ADH1t接合部に唯一のHind III クロニンググサイトを持っている。そのpGal 10. tADH1の唯一のHind IIIクロニングサイトを、Hind IIIでpGal 10. tADH1を切断し、そのカットDNAをゲル精製し、そしてT4 DNAリガーゼを使用して次のHind III-BamHIリンカーに結合することによって唯一のBamHI クロニングサイトに変えた。

30

★でスクリーニングした。この新しいベクターの構成pC1/1. Gal 10p (B) ADH1tは Hind III及びBamHIでの切断によって確認された。

【0078】

【実施例19】

MIEP+リーダーDNA配列を有する酵母MIEP発現ベクターの構成

MIEPの完全なコード域を含むDNA断片を、Spe I及びEcoRIでのpUC19. MIEP#7の切断によって生成し、そのMIEP DNAをゲル精製し、そしてT4 DNAでプラントエンドにした。酵母内発現ベクターpC1/1. Gal 10p (B) ADH1tをBamHIで切断し、子ウシ腸アルカリホスファターゼで脱リン酸し、そしてT4 DNAポリメラーゼでプラントエンドにした。そのDNAを、未切断ベク

40

★50

45

ーを除去するためにゲル精製した。MIEPの1.1 kb プラントエンド断片をプラントエンドpC1/1. Gal 10p (B) ADH1tベクターに結合し、その結合反応混合物を用いてコンピテントなE. coli DH5細胞アンピシリン耐性に形質転換した。形質転換体を<sup>32</sup>PでラベルしたDNAオリゴヌクレオチド(5' . . . AAGCTCGGATCCTAGTTGCAAT G. . . 3')へのハイブリッド形成によってスクリーニングした。このオリゴヌクレオチドはMIEPベクター結合部に重なる配列と相同するようにデザインされている。DNAの調製物をハイブリッド形成が陽性の形質転換体から作り、Kpn I及びSal Iで切断してMIEP断片がGal 10プロモーターから、発現のための正しい配向にあることを確認した。さらに、Gal 10プロモーターからMIEPコード域へのジデオキシ配列決定によってDNA構成の確証を得た。形質転換体によるMIEPの発現をウエスタン プロットによって検出した。形質転換体において産生された組換え型のMIEPは、ポリアクリルアミドゲル上をOMPCベシクルから精製されたMIEPと共に移動した、そしてMIEPに対して特異的な抗体と免疫学的に反応性であった。

【0079】

【実施例20】

5' -修飾MIEP DNA配列を有する酵母MIEP発現ベクターの構成

Hind IIIサイト、保存酵母5'非翻訳リーダー(NTL)、メチオニン スタート コドン(ATG)、成熟MIEPの最初の89個のコドン(位置+20でAspによって始まる)及びKpn Iサイト(位置+89)を含むDNAオリゴヌクレオチドをポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)を利用して生成した。このPCRはプラスミドpUC19MIEP42#7を鋳型としてかつ次のオリゴマーをプライマーとして用いて、製造業者(Perkin Elmer Cetus)によって説明されたように行なわれた。

5'CTAAGCTTAACAAAATGGACGTTACCTTGTACGGTACAATT 及び  
5'ACGGTACCGAAGCCGCCCTTCAAG3'.

MIEPクローンの5'域を除去するために、プラスミドpUC19 MIEP42#7をKpn I及びHind IIIで切断し、3.4 kbベクター断片をアガロースゲル精製した。280 bp PCR断片をKpn I及びHind IIIで切断し、アガロースゲル精製し、そして3.4 kbベクター断片と結合した。E. coli HB101(BRL)の形質転換体をDNAオリゴヌクレオチドハイブリッド形成によってスクリーニングし、陽性の形質転換体からのDNAを制限酵素切断によって分析した。変異がPCR工程の際に導入されていないことを確かめるために、陽性形質転換体の280 bpのPCRで生成されたDNAを配列決定した。得られたプラスミ

46

ドは、酵母NTL、ATGコドン、及びAspコドン(アミノ酸+20)で始まるMIEPの全オープンリーディング フレーム(ORF)からなるHind III-Eco RI挿入断片を含む。酵母MIEP発現ベクターは次のように構成された。pGAL 10/pC1/1及びpGAP/pC1/1ベクター[Vlasuk, G. P. 等、(1989)J. B.C., 第264巻、12, 106~12, 112頁]をBam HIで切断し、DNAポリメラーゼIのクレノウ断片でフラッシュエンドにし、そして子ウシ腸アルカリホスファターゼで脱リン酸した。これらの直鎖ベクターを、処理したクレノウ及びゲル精製した上記Hind III-Eco RI断片(pGAL 10/pC1/1-MIEP及びpGAP/pC1/1-MIEPを形成する酵母NTL、ATG及びMIEPのORFを含む)と結合した。サッカロミセス セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)株U9(gal 10 pgal 4-)をプラスミドpGAL 10/pC1/1で形質転換した。組換え型クローンを分離し、MIEPの発現について試験した。クローンを、37℃で約6.0のO.D.<sub>600</sub>まで2%グルコース(w/v)を含む合成培地中で振とうしながら育成した。次に、ガラクトースを2%(w/v)に加えてGal 10プロモーターからのMIEP発現を誘発した。細胞を、約9.0のO.D.<sub>600</sub>までのガラクトース誘発に次いでさらに45時間育成した。その後、細胞を遠心によって収集した。細胞ペレットを蒸留水で洗浄し、凍結した。

【0080】組換え型MIEPのウエスタン プロット酵母がMIEPを発現しているか否か調べるために、ウエスタン プロット分析を行った。12パーセント、1 mm、10~15ウェルNovex Laemmli ゲルを使用した。酵母細胞を、水中でガラスビーズを用いて破碎した(ナトリウム ドデシル サルフェート(SDS)を破碎工程に2%で使用することができる)。細胞破碎を、1分間10,000 x gで遠心することによって除去した。上清を、MIEPのポリアクリルアミドゲル精製について説明したように、サンプル ランニング バッファと混合した。サンプルを、35 mAで、OMPCを参照対照として使用して、プロモフェノール ブルー ダイ マーカーがゲルを流れ出るまで流した。タンパク質を、NOVE X転写装置を使用して、0.45 μボア サイズ ニトロセルロース紙上に転写した。転写後、ニトロセルロース紙を、リン酸塩で緩衝した塩類液中5%ウシ血清アルブミンで1時間ブロックし、その後、ラビット抗-MIEP抗血清(標準手順を使用するゲル精製MIEPでの免疫化によって生成された)の1:100希釈液の15 mlを加えた。室温で一晩中インキュベートした後、アルカリホスファターゼ複合ヤギ抗ラビット IgGの1:1000希釈液の15 mlを加えた。2時間インキュベートした後、FAST RED TRSALT(Sigma)及びナフトール-AS-MXホスフェート

47

(Sigma)を用いてブロットを顕出させた。

【0081】

【実施例21】

組換え型MIEPの微生物発現

1. 3キロ塩基対MIEP遺伝子挿入断片を含むプラスミドpUC19-MIEPを、制限エンドヌクレアーゼSpe I and Eco RIで切断した。当業界において既知の標準的な方法を用いて1.1kbp断片を分離し、アガロースゲルにおいて精製した。プラスミドpTACSD(2つのシストロンTACプロモーター及び唯一のEco RIサイトを含んでいる)をEco RIで切断した。製造業者の指示に従ってT4DNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)を使用して、1.3kbp MIEP DNA及びpTACSDベクターの両方にブラントエンドを形成した。ブラントエンドにした1.3kbp MIEP DNAを、製造業者の指示に従ってT4DNAリガーゼ(Boehringer Mannheim)を用いてブラントエンドにしたベクターに結合した。結合されたDNAを使用して、製造業者の指示に従ってE. coli株DH5a IQMAX(BRL)を形質転換した。形質転換細胞を、25μgカナマイシン/ml及び50μgペニシリン/mlを含むアガー皿の上に塗布し、37℃で約15時間インキュベートした。MIEPと相同する配列を有するDNAオリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>Pでラベルし、そして標準的なDNAハイブリッド形成技術を用いて形質転換体の皿から溶解した変性コロニーを含むニトロセルロースフィルターをスクリーニングするために使用した。ハイブリッド形成によって陽性であったコロニーについて、制限エンドヌクレアーゼを用いて遺伝子地図上で位置を決めてMIEP遺伝子の配向を決定した。形質転換体によるMIEPの発現はウエスタン ブロット分析によって検出された。形質転換体において産生された組換え型MIEPはポリアクリルアミドゲル上をOMPCベシクルから精製されたMIEPと共に移動した、そしてMIEPに対して特異的な抗体と免疫学的に反応性であった。

【0082】

【実施例22】

N. メニンギチジス(meningitidis) MIEPへのPn-Psの結合

化学的結合が、米国特許第4,882,317に開示されている方法に従って行なわれた。0.1Mホウ酸塩バッファ(pH11.5)3ml中のMIEPの10mgをエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩(EDTA, Sigma Chemicals)の10mg及びジチオトレイトール(Sigma Chemicals)の4mgと混合する。タンパク質溶液をN<sub>2</sub>で十分にフラッシュする。N-アセチルホモシステインチオラクトン(Aldrich Chemicals)をMIEP溶液に加え、混合物を室温で16時間インキュベートする。次に、それを、窒素下で4mM EDTAを

48

含む0.1Mホウ酸塩バッファ(pH9.5)の2lに対して24時間室温で2回透析する。次に、チオール化タンパク質をエルマン(Ellman's)試薬(Sigma Chemicals)によってチオール含量についてアッセイし、タンパク質濃度をブラドフォード(Bradford)試薬(Pierce Chemicals)によって測定する。Pn-PsへのMIEPの結合のために、1.5倍過剰(wt/wt)のプロモアセチル化Pn-PsをMIEP溶液に加え、pHを1N NaOHで9~9.5に調節する。反応時間の終わりにN-アセチルシステアミン(Chemical Dynamics)の25μlをその混合物に加え、窒素下室温で18時間放置する。結合体溶液を1N HClでpH3~4の間まで酸性にし、10,000xgで10分間遠心を行う。上清流体の1mlを、FPLC Superose 6B(1.6×50cm, Pharmacia)のカラムに直接かけて、結合体をPBSで溶出する。ポリサッカライド-タンパク質結合体(Pn-Ps-MIEP)を含む空隙率ピークをプールする。次に、結合体溶液を滅菌のために0.22μmフィルターを通して濾過する。

【0083】

【実施例23】

Pn-Ps-MIEP結合体の免疫原性の証明

免疫化:雄Balb/cマウス(Charles River, Wilmington, MA)を、前もって形成したミョウバン0.5ml中の2.5μg Pn-Psを使用してMIEPへ供有結合されたPn-Psで腹腔内(i.p.)に免疫する。対照マウスを、Pn-Ps-CRM[Anderson, M. E.等,(1985),J. Pediatrics, 第107巻、346~351ページ](2.5μg Pn-Ps/6.25μg CRM;ヒト用量の1/4)、Pn-Ps-DT(2.5μg Pn-Ps/1.8μg DT;一定量のPn-Psを複数回使用するようなヒト用量の1/10)、及びPn-Ps-OMP(2.5μg Pn-Ps/35μg OMP;ヒト用量の1/4)として与えられた当量のPn-Psで免疫する。Infant Rhesusサル(6~13.5週令)を、ミョウバンに吸着されたPn-Ps-MIEP結合体で免疫する。各々のサルは0.5mlの全用量について0.25mlの結合体を二つの別の場所の注射で受ける。サルを、0、28、及び30日に免疫して、血液サンプルを2~4週間毎に取る。抗体応答を、免疫グロブリン応答のクラスとサブクラスを区別するELISAによって測定する。総抗Pn-Ps抗体を定量するRIAも使用してサル応答を評価する。Pn-Ps-MIEP結合体は、IgG抗Pn-Ps抗体からなるマウスの免疫応答及び記憶応答を発生させることができる。これは、測定可能な抗Pn-Ps抗体を顕在化させないPn-Ps-CRM及びPn-Ps-DTと対照的である。このように、MIEPはPn-Psのための免疫学的キャリアー・タンパク質として機能し、Pn-Ps抗原へ共有結合した場合、抗Pn-

Ps抗体応答を発生させることができる。従って、精製MIEPは微生物ポリサッカライド結合体ワクチンの構成において異種OMP Cを置換する効果的な免疫学的キャリアー・タンパク質である。

【0084】

【実施例24】

部分的に加水分解された精製Pn18C-Psの調製

(1) 音波加水分解: Pn18C Ps粉末の3.0g分を、室温で約3~4時攪拌しながら1200ml塩類液(0.9%NaCl)中で可溶性にした後、カバーをして、一晩中4℃で保存した。次に、この溶液を、20分(5分間バーストにおいて)の間隔で全部で40分までBranson Sonifier(1/2インチフロブ、設定8)を用いて氷浴中のプラスチックビーカーの中で音波処理した。各間隔の後に、粘度を調べた。40分間後に、さらに10分間の音波処理を行い、1.218センチストークスの粘度終点を得た。加水分解されたサンプル(体積1188ml)を室温にし、酢酸ナトリウム試薬(59.2g)を3%(w/v)の最終濃度まで加えた。

(2) 血清プローブ: イソプロパノール(IPA)分別プローブ及び抗体指示終点比濁(Nephelose)アッセイ(サンプルの10ml分について行った)は、Pn18C-Psが40~50%の間のIPAで沈殿することを示した。

(3) 1回目IPA添加: 加水分解されたサンプル〔体積=1200ml(上記工程1からのもの)〕を、894ml IPAの添加(室温で攪拌しながら一滴づつ加えた)によって42.7%IPAにした。サンプルを15~30分間攪拌した後、30分間11,000xgで遠心した(Beckman JA-10ローター; 8,000rpm; 20℃)。廃物のペレットを250ml Omnimixerの中で無水EtOHと摩砕し、次に60ml焼結ガラスロウ斗に集めた。沈澱物を、ロウ斗上で直接無水EtOH、次にアセトンで洗浄し、分析の用意に真空、CaSO<sub>4</sub>(Drierite)上、室温で乾燥した。

(4) 2回目IPA添加及び中間生成物回収: 42.7%IPA上澄み流体〔体積=2016ml(上記工程3から)〕を、室温で攪拌しながら92.0ml IPAを一滴づつ加えることによって45.2%にした。サンプルを熟成し、上記工程3と同様な遠心を行った。上記工程3と同様に摩砕し、集め、洗浄しそして乾燥した。Pn18C-Ps中間体生成物の重量は1.609mgであった。

(5) 透析及び凍結乾燥: 上記工程4からのサンプルの一部分(1612.5mg)を、室温で約2時間645mlの蒸留水中で可溶性にした。この溶液(2.5mg/ml)を、透析チューブ(12,000MWカットオフ; 45mm)に移し、蒸留水に対して4℃で30時間透析した、このとき蒸留水を2回別のものに取り替え

た。次に、サンプルを凍結乾燥フラスコへ移し、ドライアイス:メタノール浴中でシュール凍結し、そしてVirtis(Freezemobile)凍結乾燥機において2~3日間凍結乾燥した。最終Ps生成物の回収は1487mgであった。

【0085】

【実施例25】

S. ニューモニアエ(Pneumoniae)18C-OMP C結合体、Pn18C-Ps-OMP C

10 A. Dowex 50×2(200~400メッシュ)テトラブチルアンモニウム型樹脂〔Dowex 50(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)〕の調製: Dowex 50×2(200~400メッシュ)H<sup>+</sup>型(500g)をH<sub>2</sub>O中でスラリーにし、カラムに充填し、1)600mlの水; 2)1000mlの6N HCl; 3)400mlのH<sub>2</sub>O(流出液がpH紙に対して中性になるまで); 4)72gの10%水性テトラブチルアンモニウムハイドロオキシド溶液(流出液がpH紙に対して強アルカリになるまで); 5)1000mlのH<sub>2</sub>O(中性まで)の順序で洗浄した。

20 【0086】B. S. ニューモニアエタイプ18Cポリサッカライド

テトラアンモニウム型〔Pn18C(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)〕の調製: Dowex 50×2(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)の60mlカラムを250mlのH<sub>2</sub>Oで洗浄した。Pn18C-ポリサッカライド(還元m.w.(650mg))を65mlのH<sub>2</sub>Oでカバーし、1時間攪拌した(その時点ですべてが溶液状であるように見えた)。この溶液をカラムにかけて重力によって浸透させた(2時間、次に真空下で1時間)。カラムを150mlのH<sub>2</sub>Oで洗浄し、一緒に合せた溶出液を凍結乾燥して655mgの18C(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)塩を得た。25mgをNMR分析及び保管材料用に取り出した。

【0087】C. 18Cの1,4-ブタンジアミン誘導体(18C-BuA<sub>2</sub>)の調製: 18C(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)(630mg)を143mlのDMSO(ジメチルスルフォキシド)でカバーし、3.25時間攪拌した。この時点ですべての固形物が溶解された、そして1mlを水含有量についてのカールフィッシャー滴定用に取り出した。H<sub>2</sub>O/mlの値は28.2マイクロモルであることが分った(全部で4ミリモル)。この溶液に165.1mgのカルボニルジイミダゾール(CDI)を加え、得られた溶液を室温で2.0時間攪拌した。40mlのH<sub>2</sub>O中に1.260gの1,4-ブタンジアミンジヒドロクロリド(BuA<sub>2</sub>·2HCl)を含む溶液を調製し、そのpHを2.5N NaOHで10.20に調節した。この溶液を氷浴中で冷却した。熟成DMSO溶液を冷BuA<sub>2</sub>溶液に徐々に加え、氷浴中でさらに10分間攪拌した。次に、それを室温で50分間攪拌した後、その溶液をSPECTRAPOR 2透析チューブに充填し、液の上部から1/2"を切り取り、そして次のように透析

した：1) 13.0時間pH7.0 0.1M NaPO<sub>4</sub>バッファの15lに対して；2) 11時間pH7.0 0.01M NaPO<sub>4</sub>バッファの15lに対して；3) 10.8時間pH7.0 0.01M NaPO<sub>4</sub>バッファの15lに対して；4) 9.5時間H<sub>2</sub>Oの15lに対して。この時点で体積は190mlであった。7.5mlアリコートを取り出し、NMRアッセイ用に別に凍結乾燥した。残りの182.5mlを、18Cの1,4-ブタンジアミン誘導体 (Pn18C-BuA<sub>2</sub>) の416mgに凍結乾燥した。約5mgのNMRスペクトルは、ブタンジアミン内部メチレン及びラムノースメチル(18Cの)共鳴の積分を比較することによって明確にされたポリサッカライドの100くり返し単量体単位当り10ブタンジアミン残基の“負荷 (loading)”を示した。

【0088】D. 18Cのプロモアセチル化ブタンジアミン誘導体 (Pn18C-BuA<sub>2</sub>-BrAc) の調製：18C-BuA<sub>2</sub> (416mg) を、0.1M pH9.04バッファ (Kolthoff ホウ酸塩-リン酸塩) の36mlでカバーし、攪拌して溶液を作った。次に、4.48mlのアセトニトリル中の256mg p-ニトロフェニルプロモアセテートを加えた。得られた混合物を4℃で20時間攪拌した。それをSPECTRAPOR2チューブにおいて次のように透析した：1) 6時間15l H<sub>2</sub>Oに対して；2) 6時間15l H<sub>2</sub>Oに対して；3) 6時間15l H<sub>2</sub>Oに対して。この時点で60mlの体積があり、それから1.7mlをアッセイ (NMR, Duchterlony 及び Viscotek) のために取り出した後、2.42gの乾燥pH8リン酸塩バッファ塩 (0.1M pH8NaPO<sub>4</sub>溶液を凍結乾燥することによって調製した) を加えた。溶解した後、それを0.2ミクロンCORNINGフィルターを通して濾過して、18C-BuA<sub>2</sub>-BrAcの水性pH8溶液を得た。濾過はゆっくりであり、4カップフィルターを必要とした。

【0089】E. Pn18C-BuA<sub>2</sub>-BrAcへのOMPC (N. メニンギチジス) の結合：外膜タンパク質複合体 (N. メニンギチジス, OMPC 3.2mg/ml, 80ml) を4つの25ml遠心チューブに充填し、4℃で2時間60Tiローターにおいて43,000rpm (43K) で遠心した。チオール化混合物を、40mlのpH11.09Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>バッファに680mgのEDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩) 及び120mgのジチオトレイトール (DTT) を溶解することによって調製した。320mgのN-アセチルホモシステインチオラク톤を加え、次にこの溶液を0.2μコーニングフィルター (カップタイプ) を通して濾過した。上記遠心からのペレットを濾過されたチオール化混合物 (全部で20ml) の5mlで取り出し、DOUNCEホモジナイザーへ移し、再懸濁させた。チューブを、チオール化溶液の別の2/10mlを

連続的に移すことによってすすいだ。一緒に合せた溶液をDOUNCE中でホモジナイズし、全再懸濁物質 (40ml) を100ml丸底フラスコへ移した。ガラス器具をチオール化溶液の別の20mlですすぎ、反応フラスコに加えた。フラスコを隔膜でシールしそしてFIRESTONEバルブを用いて空気をN<sub>2</sub>で置換した後、反応混合物を18.5時間熟成した。次に、60mlを4つの遠心チューブに分け、その各々に1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (水性) をのせて、43K、4℃で2時間遠心した。上清を除き、ペレットを0.1M NaPO<sub>4</sub> pH8バッファ中に再懸濁した (全量40mlが最終再懸濁液体積であった)。この溶液を2つの25ml遠心チューブ (ポリカーボネート) へ等しく移し、ガラス器具 (DOUNCE等) を約10mlのpH8リン酸塩バッファですすぎ、遠心チューブの仕上げをするために使用した。次に、2回目の超遠心 (2時間、4℃、43K) を行った。ペレットを30mlのpH8、0.1M PO<sub>4</sub>バッファ中に再懸濁した。Ellmanアッセイは全部で24マイクロモルのSH又は約100ナノモル/mgのOMPCを示した。チオール化タンパク質を100ml丸底フラスコへ移し、それに濾過された18C-BuA<sub>2</sub>-BrAc溶液を加えた。得られた反応物 (すなわち、チオール化OMPCを有する18C-BuA<sub>2</sub>-BrAc) を室温で89時間N<sub>2</sub>ボックス中のN<sub>2</sub>下で (ガス抜きしながら) 熟成した。反応物を次のように仕上げた：5mlのpH8、0.1M NaPO<sub>4</sub>バッファ中に75mgN-エチルマレイミド (NEM) を含む溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、上記反応混合物に2mlを加えて4時間熟成した。2.5mlの0.1M pH8 PO<sub>4</sub>バッファ中のN-アセチルシステアミンの0.5mlを0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、この溶液の1.0mlを反応物に加えて22.5時間熟成した。完成された生成物を4つの25ml遠心チューブに等しく充填し、全部で8mlのpH8 0.1M PO<sub>4</sub>バッファをのせて、43K、4℃で2時間遠心した。上清を除いた後、ペレットをDOUNCEホモジナイザーにおいて全部で40mlのTEDバッファ中に再懸濁し、ガラス器具をTEDバッファの別の10mlですすぎ、その溶液を2つの25mlチューブに移した。これらのチューブを室温で15.25時間保存した後、43K rpm、24℃で2時間遠心した。得られたペレットをDOUNCEホモジナイザーにおいて全部で30mlのTEDバッファ中に再懸濁し、2つの25ml遠心チューブに移し、ガラス器具をTEDバッファの別の20mlですすぎ、そして43K、4℃で2時間再遠心した。ペレットを50mlのpH7リン酸塩バッファ中に再懸濁し、3回目の遠心に43K、4℃で2時間かけた。ペレットを82mlの水に再懸濁し、20.5ml部分において2つの50mlプラスチック無菌 (FALCON) 遠心チューブへ移した。4℃で18時間熟成した



後、結合体調製物をTJ-6遠心機のTHローターにおいて1000rpmで3.5分間遠心した。最終生成物結合体懸濁液を、タンパク質(Lowry)、18Cポリサッカライド(フェノール/硫酸)、非結合ポリサッカライド(サイズ排除クロマトグラフィー-速度ネフェロメトリー(rate Nephelometry))及びアミノ酸(SPINC O)についてアッセイした。

ポリサッカライド=339マイクログラム/ml

タンパク質=2.57mg/ml

遊離ポリサッカライド:<5%(実験誤差の限界)

S-カルボキシメチルホモシステイン/リシン=0.025

S-カルボキシメチルシステアミン/リシン=0.005

【0090】

【実施例26】

Pn4-Ps中間体の作成

(1)音波加水分解

Pn4-Ps粉末の0.1gを400mlの食塩水(0.9%NaCl)に入れ、室温で約4時間攪拌して溶解した。この溶液をプラスチックビーカー中氷浴上で、ブランソン音波発生機(Branson Sonifier、1.5インチプローブ、セッティングB)を用いて10分間隔、全部で20分間音波処理した。一区切りごとに粘度をチェックした。20分後には粘度は1.267センチストロークとなった。加水分解産物を室温に戻してから、酢酸ナトリウム試薬(18.7g)を加えて終濃度を3%(w/v)とした。

(2)血清学的プローブ

サンプルの10mlを用いて、イソプロパノール(IPA)分画の予備試験と抗体による終点比濁アッセイを行なうと、Pn4-Psは45-55%IPAで沈殿することが分かった。

(3)第一回IPA添加

加水分解したサンプル(液量385ml、上記工程

(1)で得られたもの)に379mlのIPAを室温で攪拌しながら滴下して加え、IPA濃度を49.7%とした。サンプルは15-30分攪拌を続けた後、11,000xgで30分間遠心した(ベックマンJA-10ローター、8,000rpm、20℃)。ペレットは純EtOHとともに250ml容のオムニミックスジャー(Omnimix Jar)中で摩砕し、60ml容焼結ガラスローット上に集めた。析出物はローット上で直接純EtOH、アセトンの順で洗浄し、真空下、室温、CaSO<sub>4</sub>(DRIERITE)で乾燥して分析用に供した。

(4)第二回目のIPA添加と生成物の回収

49.7%IPA上清液(液量727ml、上記工程

(3)から得られたもの)に38mlのIPAを室温で攪拌しながら加えることにより、IPA濃度を52.2%とした。サンプルは熟成後、工程(3)と同様に遠心し

た。工程(3)と同様にペレットを摩砕し、回収し、洗浄し、乾燥した。Pn4-Ps生成物の重量は516mgであった。

(5)透析と凍結乾燥

工程(4)で得られたPn4-Psサンプルの一部(500mg)を200mlの蒸留水に室温で2-3時間かけて溶解した。この溶液(2.5mg/ml)を透析チューブ(分画分子量12,000、45mm)に移し、蒸留水に対して、4℃、27時間透析した。途中で2回蒸留水を交換した。ついでサンプルを凍結乾燥用の容器に移し、ドライアイス:メタノール浴中で薄く凍らせ、Virtis(Freezemobile)凍結乾燥機で2-3日間凍結乾燥した。回収されたPn4-Psの最終製品は491mgで、K<sub>d</sub>は0.69であった。この開示から、当業者にとって他のカルボキシル基を含むPn-Psのサブタイプ、たとえばPn1-Ps、Pn5-Psもここに示した方法により調製でき、おなじく酸性多糖であるPn4-PsあるいはPn9V-Psと同様に結合体とすることができることは自明である。

【0091】

【実施例27】

S. pneumoniae type4-OMPC結合体であるPn4-Ps-OMPC

A. ダウエックス50×2(200-400メッシュ)のテトラブチルアンモニウム型樹脂の調製〔ダウエックス50(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)〕

ダウエックス50×2(200-400メッシュ)のH型(500g)をH<sub>2</sub>O中でスラリーとし、カラムに充填して順番に、1)H<sub>2</sub>O 600ml、2)6NHCl 1000ml、3)H<sub>2</sub>O 400ml(流出液がpH試験紙で中性になるまで)、4)10%テトラブチルアンモニウムヒドロキシド水溶液72g(流出液がpH試験紙で強アルカリになるまで)、5)H<sub>2</sub>O 1000ml(中性になるまで)で洗浄した。

【0092】B. Pneumoniae type 4 多糖のテトラブチルアンモニウム型〔Pn4(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)〕の調製  
ダウエックス50×2(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)の65mlのカラムを520mlのH<sub>2</sub>Oで洗浄した。Pn4-多糖(m.w.還元型400mg)を35mlのH<sub>2</sub>Oで覆い、全部が水面下にあるように気を付けながら20分間攪拌した(攪拌は1晩継続した)。この溶液をカラムにのせ、重力により浸透させ、カラムを150mlのH<sub>2</sub>Oで洗浄した。溶出液を合し、凍結乾燥して504mgのPn4(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)塩を得た。

【0093】C. Pn4の1,4-ブタンジアミン誘導体(Pn4-BuA<sub>2</sub>)の調製

Pn4(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)(97mg)を16mgのDMSO(ジメチルスルホキシド)で覆い、溶液となるまで52℃で15分かけて攪拌した。この時点で固体はすべて溶解し、この溶液を室温まで冷却した。この溶液に、16

55

0.5 mLのDMSOに溶解した2 mgのカルボニルジイミダゾール (CDI) を加え、できた溶液を室温で1.0時間攪拌した。5 mLのH<sub>2</sub>Oに0.500 gの1,4-ブタンジアミンジヒドロクロリド (BuA<sub>2</sub> · 2HCl) を溶解した液を調製し、pHを5.0 N NaOHで10.20に調節した。この溶液を氷浴中で冷却し、熱成させたDMSO溶液を冷BuA<sub>2</sub> 溶液に徐々に加え氷浴中でさらに5分間攪拌した。ついでこれを室温で1時間攪拌し、その後溶液をスペクトロポア-2の透析チューブに入れ、液の上面から2分の1インチのところをクリップでとめ、以下のように透析した。1) pH7.0の0.1 M NaPO<sub>4</sub>緩衝液4リットル、15.0時間、2) pH7.0の0.01 M NaPO<sub>4</sub>緩衝液4リットル、9時間、3) pH7.0の0.01 M NaPO<sub>4</sub>緩衝液4リットル、21時間、4) H<sub>2</sub>O4リットル、20時間。ついで溶液を凍結乾燥して、70 mgのPn4の1,4-ブタンジアミン誘導体 (Pn4-BuA<sub>2</sub>) を得た。約5 mgのサンプルについてのNMRスペクトルから、100個の多糖繰返し単位あたり、22個のブタンジアミン残基が付加されたことが、ブタンジアミン内部のメチレンと (Pn4の) N-アセチルメチル基との共鳴の積分を比較することにより求められた。

【0094】D. Pn4のプロモアセチル化ブタンジアミン誘導体 (Pn4-BuA<sub>2</sub>-BrAc) の調製  
Pn4-BuA<sub>2</sub> (54 mg) を、5.5 mLの0.1 M pH9.04緩衝液 (コルトフのホウ酸-リン酸) で覆い、溶液となるまで攪拌した。1.0 mLのアセトニトリル中の55 mgのp-ニトロフェニルプロモアセテートをこれに加え、生じた混液を17時間4℃で攪拌した。これをスペクトロポア-2の透析チューブ中で以下の様に透析した。1) 16リットルの水に対して24時間、2) 16リットルの水に対して8時間、3) 16リットルの水にたいして23時間。この時点で容積は12.5 mLであり、これから1.0 mLをとって分析に供し (NMR、オキタクローニ、ビスコテック)、残りに275 mgの乾燥pH7リン酸緩衝塩 (0.1 MのpH8 NaPO<sub>4</sub>溶液を凍結乾燥して調製) を加えた。溶解させた後、0.2ミクロンのコーニングフィルターで濾過すると、Pn4-BuA<sub>2</sub>-BrAcのpH8溶液が得られた。

【0095】E. OMPC (N. meningitidis) のPn4-BuA<sub>2</sub>-BrAcへの結合  
外膜蛋白複合体 (N. meningitidis, OMPC, 4.34 mg/mL) (5 mL) を80 Tiローター中43,000 rpm (43 K) で4℃、2時間遠心した。チオール化用混合液は85 mgのEDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩) と15 mgのジチオスレイトール (DTT) を10 mLのpH11.09 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>緩衝液に溶解して調製した。50 mgのN-アセチルホモシステインチオラクソンを加え、溶液を0.2ミクロン

56

フィルターで濾過した。上述した遠心のペレットを5 mLの濾過したチオール化用混液ではがし、ドーンスホモジナイザーに移して再懸濁させた。再懸濁を遠心管に移し、蓋をしてファイアストンバルブを用いて空気を窒素に置換した。反応混液を19時間熱成させ、遠心管に移し、1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>水溶液を上層して2時間4℃43 Kで遠心した。上清を除き、ペレットを10 mLの0.1 M NaPO<sub>4</sub> pH8緩衝液に再懸濁した。この液を遠心管に移し、2回目の超遠心を行なった (2時間、4℃、43 K)。ペレットをセクションDで調製した11.5 mLのPn4-BuA<sub>2</sub>-BrAcに再懸濁した。エルマン検定から合計3.44マイクロモルのSHすなわち約158ナノモルのSH/mgのOMPCであった。得られた反応物 (チオール化OMPCとPn4-BuA<sub>2</sub>-BrAc) は窒素下で (脱気して) N<sub>2</sub>ボックス中室温で66時間熱成させた。反応物は以下のようにキャップ化した: 5 mgのN-エチルマレイミド (NEM) を1 mLのpH8、0.1 M NaPO<sub>4</sub>緩衝液に溶解したものを0.22ミクロンのフィルターで濾過し、上記の反応混液に加え、混液を5時間熱成させた。ついで0.1 mLのN-アセチルシステアミンを0.4 mLの0.1 M pH8リン酸緩衝液に加えたものを0.22ミクロンのフィルターで濾過し、この液を反応混液に加えて14.5時間熱成させた。反応混液を43 K、4℃、2時間遠心し、ペレットを8 mLの1×TED緩衝液に再懸濁した。この液を室温で一晩熱成させ、ついで43 K、4℃、2時間遠心した。ペレットを8 mLのTED緩衝液に再懸濁し、直ちに43 K、4℃、2時間の再遠心を行なった。ペレットを10 mLのpH7.0、0.1 Mのリン酸緩衝液に再懸濁し、43 K、4℃、2時間の再遠心を行なった。最終ペレットは7.5 mLの水に懸濁した。4℃で一晩熱成させたのち、懸濁液を1000 rpmで3分遠心し上清を最終結合体として回収した。分析: ローリー法による蛋白質: 0.920 mg/mL  
フェノール-硫酸法: 0.212 mg/mL  
Ps/Pro=0.23  
SCMHC/lys=0.031  
SCMC/lys=0.022

この結合体をマウスあるいはアフリカミドリザルに投与すると、高力価の抗Pn4-Ps抗体が誘導された (Pn4-Ps 特異的ELISA検定で測定)。

【0096】

【実施例28】

Pn9V-Ps中間体の作成

(1) 音波加水分解

Pn9V-Ps粉末の0.1 gを400 mLの食塩水 (0.9% NaCl) に入れ、室温で約4時間攪拌して溶解した。この溶液をプラスチックビーカー中氷浴上で、ブランソン音波発生機 (Branson Sonifier, 1.5 インチプローブ、セッティングB) を用いて3分間音波

57

処理した。このあと粘度をチェックした。13分後、もう一分音波処理すると粘度は1.117センチストロークとなった。加水分解産物を室温に戻してから、酢酸ナトリウム試薬(19.5g)を加えて終濃度を3%(w/v)とした。

## (2) 血清学的プローブ

サンプルの10mlを用いて、イソプロパノール(IPA)分画の予備試験と抗体による終点比濁アッセイを行なうと、Pn9V-Psは40-45%IPAで沈殿することが分かった。

## (3) 第一回IPA添加

加水分解したサンプル(液量391ml、上記工程

(1)で得られたもの)に281mlのIPAを室温で攪拌しながら滴下して加え、IPA濃度を41.8%とした。サンプルは15-30分攪拌を続けた後、11,000xgで30分間遠心した(ベックマンJA-10ローター、8,000rpm、20℃)。ペレットは純EtOHとともに250ml容のオムニミックスジャー(OmnimixJar)中で摩砕し、60ml容焼結ガラスロート上に集めた。析出物はロート上で直接純EtOH、アセトンの順で洗浄し、真空下、室温、CaSO<sub>4</sub>(DRIERITE)で乾燥して分析用に供した。

## (4) 第二回目のIPA添加と生成物の回収

41.8%IPA上清液(液量637ml、上記工程(3)から得られたもの)に28.6mlのIPAを室温で攪拌しながら加えることにより、IPA濃度を44.3%とした。サンプルは熟成後、工程(3)と同様に遠心した。工程(3)と同様にペレットを摩砕し、回収し、洗浄し、乾燥した。Pn9V-Ps標品の重量は342.2mgであった。

## (5) 透析と凍結乾燥

工程(4)で得られたPn9V-Psサンプルの一部(347mg)を139mlの蒸留水に室温で4-5時間かけて溶解した。この溶液(2.5mg/ml)を透析チューブ(分画分子量12,000、45mm)に移し、蒸留水に対して、4℃、25時間透析した。途中で2回蒸留水を交換した。ついでサンプルを凍結乾燥用の容器に移し、ドライアイス:メタノール浴中で薄く凍らせ、Virtis(Freezemobile)凍結乾燥機で2-3日間凍結乾燥した。回収されたPn9V-Psの最終製品は303.5mg、K<sub>d</sub>=0.60であった。

## (6) 第三回目のIPA添加と生成物の回収

44.3%IPA上清液(液量655ml、上記工程(4)から得られたもの)に30.8mlのIPAを室温で攪拌しながら加えることにより、IPA濃度を46.8%とした。サンプルは成熟後、工程(3)と同様に遠心した。工程(3)と同様にペレットを摩砕し、回収し、洗浄し、乾燥した。Pn9V-Ps生成物の重量は410.8mgであった。

## (7) 透析と凍結乾燥

58

工程(6)で得られたPn9V-Psサンプルの一部(420.4mg)を168mlの蒸留水に室温で4-5時間かけて溶解した。この溶液(2.5mg/ml)を透析チューブ(分画分子量12,000、45mm)に移し、蒸留水に対して、4℃、25時間透析した。途中で2回蒸留水を交換した。ついでサンプルを凍結乾燥用の容器に移し、ドライアイス:メタノール浴中で薄く凍らせ、Virtis(Freezemobile)凍結乾燥機で2-3日間凍結乾燥した。回収されたPn9V-Psの最終製品は342.5mg、K<sub>d</sub>=0.65であった。

(8) 当業者にとって工程(4)および(6)の標品が各サブフラクションの加重平均特性的分析特性を有する単一標品として、より多数のIPAを加えて一緒に回収し、ついで透析、凍結乾燥を行なえるものであることはあきらかである。また当業者にとってPn1-Ps、Pn5-PsもPn4-PsあるいはPn9V-Psと同様に調製できることは自明のことである。

【0097】

## 【実施例29】

### 20 Pn9V-PsとOMPCの結合

実施例28で調製したPn9V-Psは実施例27に示したPn4-Psと同様の方法で結合体とした。

【0098】

## 【実施例30】

Pn9V/18C中のアセテート及びPn4中のビルベートの量的決定

肺炎双球菌(Pn)のカプセル状ポリサッカライド(Ps)の製造の間にPn4-Ps中のO-ビルベート並びにPn9V-Ps及びPn18C-Ps中のO-アセテート基の残留量の量を測るため一つの方法が開発された。O-アセチル若しくはO-ビルベート基は加水分解により最初に放出され、それから、抑制された伝導性で連結された高効率陰イオン交換クロマトグラフィを利用して、PnPs水解物中のアセテートとビルベートは同定され計量された。未置換の及び処置されたPn4、Pn9V、及びPn18Cのサンプルはこの方法で分析された。予備的な結果は、未処置の及びサイズ化されたPn4に対して各Ps繰り返し単位に対するビルベートが約1:1及び0.8:1のモル比を示した。Pn18C-Psにおける各Ps繰り返し単位に対するアセテートのモル比は、未処置のそしてサイズ化されたサンプルに対して各々1:1及び0.8:1、そして未処置のそしてサイズ化されたPn9Vに対して各々1.7:1及び1.5:1であることが発見された。Pn18C-Ps-OMPC結合水性バルクのサンプルは又各Ps繰り返し単位に対するO-アセテートのモル比について分析され、約0.5:1であることが見いだされた。ビルベート基は第4型カプセル状ポリサッカライドにおける有力な免疫検出物であり、その除去は免疫学的特性において特徴づけられた変化を生じさせるということが報告されて

いる [Heidelberger, M., Dudman, W. F., 及び Nimic h, W., 'Immunochemical relationships of certain capsular polysaccharides of Klebsiella, pneumococci, 及び Rhizobia' J. Immunol., 104:1321-1328, (1970); Higginbotham, J. O., Heidelberger, M., 及び Gotschlich E., 'Degradation of a pneumococcal type-specific polysaccharide with exposure of group-specificity.' Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67:132-142, (1970)]。同様に、型 Pn18C-Ps ポリサッカライドにおける O-アセテート基の除去はその免疫学的特性を破壊する [Estrada-Parra, S., 及び Heidelberger, M., 'The specific polysaccharide of type XVIII pneumococcus' Biochemistry, 2:1288-1294 (1963)]。従って、Pn18C-Ps 及び Pn4 におけるアセテートとビルベートの決定のための量的な方法を開発することが必須であった。デー O-アセチレート化された Pn9V は比濁計測定によって決定されるような抗原反応性を有しなかったことから、Pn9V における O-アセチル基はまた Pn9V の免疫学的構造における重要な役割をも演ずることができる。我々は、O-アセテートはアルカリ条件 (pH11) 下 4℃ において Pn9V 及び Pn18C-Ps から容易に放出されること及び O-ビルベートは 65℃ で加熱の上で Pn4 から容易に放出されるこ\*

時間	緩衝液 1/%	緩衝液 2/%	緩衝液 3/%	緩衝液 4/%	流量/(ml/min)
0	98	2	0	0	1
12.5	98	2	0	0	1
12.6	58	2	0	40	1.5
20.0	58	2	0	40	1.5
20.1	98	2	0	0	1.5
30.0	98	2	0	0	1.5
30.1	98	2	0	0	1
50.0	98	2	0	0	1

これらの条件と 3  $\mu$  ジーメンズの感度の検出器を用いて、およそ 5.2 及び 9.5 分の保持時間で溶出するアセテート及びビルベートの各々 4 nmol が、それぞれ容易に検出された。

#### 【0100】試料調製

メルク社製造部門からの精製された PnPs 試料を、Aquastar V300 容積測定式水分滴定計を用いることによってカール・フィッシャー滴定に付し、残余量の H<sub>2</sub>O を含むと決定された。それから ml あたり 1.0 mg 乾量の濃度で Milli-Q H<sub>2</sub>O 中に溶解させた。試料 (100  $\mu$ g/ml) が室温で 16 時間 2mM NaOH にて処理され、Pn9V-Ps 及び Pn18C-Ps 試料から O-アセテートが分離された。Pn4-Ps 試料は Pn4 からの O-ビルベートの分離のため 65℃ で 16 時間 1mM HCl 中で加水分解された。サイズ化された Pn9V 及び Pn18C-Ps 及び Pn18C-Ps-OMPC 結合水性バルクの試料もまた高 pH 陰イ※50

\*とを発見した。我々はアセテートとビルベートは 0.98mM NaOH の 1ml/min の流量及び移動相として 2% MeOH で OmniPac PAX500 カラムを用いて加水分解された PnPs 試料から分離できることを発見した。検出は再生試薬として 10ml/min の流量で 25mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いる被抑制伝導性検出 (suppressed conductivity detection) によって成された。各々 Pn18C-Ps、9V 及び Pn4 からの O-アセテート及び O-ビルベートの量的 HPLC 分析のための最も望ましい加水分解条件は、この例中に開示される。

#### 【0099】装置編成

Dionex Bio LC が OmniPac PAX-500 ガード、及び分析カラム (4.6  $\times$  250mm) とともに用意された。被抑制伝導性検出は再生試薬として 25mN 硫酸を用いて成された。流量は Dionex オートレジェンユニットで 10ml/min に設定された。加水分解された PnPs の試料からアセテートとビルベートを分離するための移動相及び勾配プログラムは以下の表に示される：

緩衝液 1	—	1mM 水酸化ナトリウム
緩衝液 2	—	100% メタノール
緩衝液 3	—	200mM 水酸化ナトリウム
緩衝液 4	—	水

※オン交換クロマトグラフィーによってモノサッカライド構成分析及びパルス電流滴定検出に付された。モノサッカライド構成分析は、サイズ化され水性結合大の試料中の PnPs の正確な濃度を得るために行われた。アセテート、ビルベート及び N-アセチルマンノスアミン標準物は Milli-Q H<sub>2</sub>O 中に 200nmol/ml の濃度で溶解された。

#### 【0101】試料及び標準の加水分解

Pn18C-Ps のデー O-アセチルアクションが、四つの NaOH 濃度 (1, 2, 5, 及び 50mM)、種々の温度 (4, 25, 45, 及び 65℃) 及び種々の時間 (3, 5, 及び 16 時間) で Pn18C-Ps を処理することで検討された。アセテート、ビルベート及び N-アセチルマンノスアミンの標準溶液も、デー O-アセチレーションのために必要な条件はまたアセテート/ビルベートの減成に若しくは N-アセチル基の損失に帰着するかどうかを決定する研究中に含まれた。種々の濃度

## 61

(1, 10, 100mM)、時間(3, 5, 及び16時間)、そして温度(65, 85, 及び100℃)における水酸化ナトリウム(50mM/100℃/16h)若しくは塩酸での処理を続けてPn4からのビルベートの分離が研究された。

## 【0102】比濁計

デーオーアセチレーション若しくはデーオービルベレーション前後のPn9V-Ps、Pn18C-Ps、及びPn4-Psの比濁分析的活性が測定された。試料は1, 1.5, 5, 及び2.5µg/mlに希釈された。

【0103】高性能分子ふるいクロマトグラフィー(High Performance Size Exclusion Chromatography: HPSEC)

デーオーアセチレーションまたはデーオービルベレーション前後のPn9V-Ps、Pn18C-Ps及びPn4のHPSECが測定された。流量制限器を装備した7.5x600mm TSK G6000PWカラムが50℃、800-1000psiで加熱され0.2M酢酸ナトリウム0.3ml/minで平衡にさせた。試料60µg(1mg/ml)をカラムに注入し、移動速度0.3ml/minで溶出した。カラム溶離剤は0.5ml/minの流速で0.5M NaOHの後カラム追加物と混合し、Dionex パルス電流滴定検出器でモニターして、Kdを測定した。

## 【0104】アッセイ感受性及び線型性

検出器線の線型性及び感受性がビルベート及びアセテートの両方に対して3µジーンズで決定された。ビルベート及びアセテートは低い方の限界として0.125nmolまで検出可能であった。双方の成分の検出器応答はビルベート及びアセテートにつき各々0.9999及び0.9992の相関係数で2nmolを通じて線型である。

【0105】Pn18C-Psから分離されるオーアセテートのオプティミゼーション

時間進行加水分解P18C-Psの予備的研究は、低温でのアルカリ加水分解に対するオーアセチル基の不安定\*

## 62

\*性を明らかにした。2mM水酸化ナトリウムは16時間の培養でPn18C-Psを完全にデーオーアセチレートへ十分であった。より高い温度(>25℃)処理がPn9V オーアセテートの測定を妨げるN-アセチルマンノスアミンからのN-アセテートを放出することが見いだされた。PnPsからのオーアセテートの除去のための最も望ましい加水分解条件は4℃で16時間であることが見いだされた。1%以下のアセテートが室温で16時間2mM NaOHで処理されたN-アセチルマンノスアミンの標準から分離されることが見いだされた。

【0106】Pn4から除去するオービルベートのオプティミゼーション

Pn4の加水分解研究は当初水酸化ナトリウム加水分解を用いることによって請け負われた。水酸化ナトリウムが用いられたときビルベートは殆ど回収されなかったということが速やかに発見された。初期の制御研究で、ビルベートは100℃でH<sub>2</sub>O中のPn4から分裂されたということを明らかにされた。この情報で、上昇温度でのHCl加水分解を用いてPn4からのオービルベート放出のオプティミゼーション研究を行うことが決定された。ビルベートの幾らかの減成がより高い温度で見られた。これはPn4同様の条件の下で加水分解されたビルベート標準の例で明示できる。65℃で16時間1mM HCl中で加水分解が行われたときビルベートの最大の回収が生じた。

【0107】PnPs試料でのオーアセテート及びオービルベートの分析

出発PnPs、サイズ化されたPnPsそして一つのPn18C-Ps-OMPC結合物を代表する種々の試料が、Pn9V-Ps/18C中のオーアセテートを放出するため室温下2mM NaOH中での若しくはPn4-Ps中のオービルベートを放出するため65℃下1mM HCl中での加水分解の後上述されたHPLC法によってオーアセテート/ビルベートに関して分析された。この研究の結果を以下に示す：

試料 各Ps繰り返し単位に対するビルベート/アセテートの比

Pn4、試料1	1.0
Pn4、試料2	0.8
Pn9V、試料1	1.7
Pn9V、試料2	1.5
Pn18C-Ps、試料1	1.0
Pn18C-Ps、試料2	0.8
Pn18C-Ps-OMPC 水性大	0.5

結果は、サイズ化されたPnPs中の側鎖基の保持はPn9V-Psに関しておよそ90%、そしてPn4及び18Cに関して80%であった。Pn18C-Ps-OMPC接合水性大におけるオーアセテートの保持はおよそ50%であった。Pn18C-PsとPn4の理論的※50

※な値はPs繰り返し単位1mol当たりアセテート若しくはビルベート1molでありPn9Vに対してその比が2:1である。〔Jansson, P-E., Lindberg, B., 及び Lindquist, U.'Structural studies of the capsular polysaccharides from Streptococcus pneumoniae Typ

e4. 'Carbohydr. Pes., 95: 73-80, (1981). Lugrowski, C. 及び Jennings, H. J. 'Structural determination of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 18C. 'Carbohydr. Pes. 131: 119-129, (1984). Perry, M. B., Daoust, V., 及び Carlos, D. J. 'The specific capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 9V. 'Can. J. Biochem. 59: 524-533, (1981) ]。Pn18C-Ps-OMPC接合物において見出されるO-アセテートのより低い保持は、低温でのアルカリ条件に対してのO-アセチル基加水分解の感受性から予想される。試料Pn4、Pn9V、及びPn18C-Ps及びデ-0-ビルビレート化された若しくはデ-0-アセチレート化された試料の比濁計的活性が測定された。結果は、たとえ未処理試料のKdでも比濁活性はこれらの側鎖基の除去の後には完全に失われた、ということを示した。Kdのは上述したHPSEC法によって得られた。しかしながら、穏やかな酸加水分解によるデ-0-ビルビレーション後のPn4のKdは0.60から0.68に上昇し、その出現はその塩の体積に近い。Pn4及びPn18C-Psのための抗原性日数は、肺炎双球菌ポリサッカライド免疫学的反応性におけるこれらの側鎖基の重要性に関して他の調査者の仕事を支持する。Pn9Vに関する結果はグルクロン酸に加えて、この分子のO-アセチル基が同様に重要な免疫学的決定因であることを示唆している。以上のように、この方法によって、Pn4中のO-ビルビケタール並びにPn9V及びPn18C-Ps中のO-アセテートの量的分析のための、迅速で敏感な手段が開発された。この手段はPn4、Pn9V、及びPn18C-Psというポリサッカライドの抗原的構造を残すためにそれらのサイズ化と結合のための正しい過程を定義することにおいて有意義である。

【0108】

【実施例31】

Pn6B-Ps-MIEP結合物の単離

1. 2つの結合反応混合物試料（一つは他方のH<sub>2</sub>O透析された試料を表わす）が使用されるまで3-8℃で保存された。

2. 0.2MOPS pH7.2緩衝剤が該試料に加えられ、約7mMという最終濃度が得られた。固体GuHClが該試料に加えられ、4.2Mという最終の濃度が達成された（注：GuHCl 1.42g/試料mlが、固体のGuHClの添加のために体積の増加を補償するために加えられなければならない。同様に、体積増加を勘案するために緩衝剤添加が調整されなければならない。その結果試料組成がカラム溶出液組成により接近する。あるいは、試料はクロマトグラフィに付す前にカラム溶出液に対し透析されることができよう）。

3. 試料の2.8ml（ローリープロテインアッセイ

（lowry protein assay）に基づいたプロテイン約1mgを含有する）を、0.6ml/minの流速で6mGuHCl 10mM MOPS pH7.2において平衡に達したセパクリル（sephacryl）S-1000の12.6×96cmカラムに注入した。カラム溶出液が280nmで連続的にモニター（perkin Elmer LC 235ダイオードアレイ検出器）され、3mlのフラクションが収集された。

4. プロテイン分配はA280に基づいており（スペクトルと同じく）そしてPn6B-Ps分配はPn6B-Ps特定のRIAアッセイに基づいている。Pn6B-Ps-BrAc単独の溶出部分に基づいて、そして不活性化されたMIEPとの物理的な混合物において、PSとプロテインの両方を含む断片溜を作成し、該Pn6B-Ps-BrAcについて観察される位置から明確に溶出したものがPn6B-Ps-MIEP結合物として推定に基づいて明示された。

5. 溜はYM-30膜を用いての限外ろ過によって濃縮され、Milli-Q H<sub>2</sub>Oを用いてろ過された。プロテインとPn6B-Ps内容量は量的組成研究から見積もられた。SCMHCはアミノ酸分析によって検出された。

【0109】

【実施例32】

肺炎双球菌ポリサッカライドPn18C-Ps直接RIAアッセイ

このアッセイは肺炎双球菌ポリサッカライド型18Cの計量のために用いられる。それは多層サンドイッチRIAアッセイである。ラビット（Rabbit）anti-Pn18C-Psがポリスチレンビーズにヒートされる。ビーズはPn18C-Psを含有する試料溶液中にて培養される。培養後、ビーズは洗浄され、Pn18C-OMPCに対するマウス抗体を含有する第二溶液中で再培養される。この培養後、ビーズは洗浄され、<sup>125</sup>I-ヤギ抗マウスIgGを含有する溶液中で3回培養する。プレートは再度洗浄され、その後ビーズは計量のためプラスチックチューブに移される。P18C-Psの未知の試料は計量のため標準曲線に比較される。

【0110】装置

1. RIAキット：Abbot Labs、診断法部門、カタログNo. 6171-10

2. クイックウォッシュシステム、Abbot Labs、診断法部門

3. 可調整ピペット及び使い捨てピペットチップ（エッペンドルフデジタルを参照）。

4. ガンマカウンター（Abbott Autologic 参照）

5. 鏡面仕上げの1/4" ポリスチレンビーズ、Precision Plastic Ball Co., 3000 N, Cicero Ave., Chicago, Illinois 60641。

【0111】試薬

1. ニューヨーク州公共医療施設Anti-Pn18

C-Ps抗体ロットR18-44若しくはその等価物。  
2. マウスanti-Pn18C-Ps OMPCアンチセラ (pool 11260-235若しくはその等価物)。

3. ゴート、アンチマウスIgG<sup>125</sup>I-ラベルされたアンチセラ: MA02118、ボストン、アルバニーストリート549、ニューイングランドヌクレアー、NEX159

4. インキュベーション緩衝剤: 次のものを含有するRCM8

1. 0% BSA Sigma A2153  
0.1% アジド Sigma S2002

5. 希釈液

胎児牛血清 8部 Sigma F3885

ヤギ血清 1部 Sigma G6767

ウサギ血清 1部 Sigma R4505

TWEEN 20 0.05% Sigma P1379

アジド 0.1% Sigma G2002

3. anti-Pn18C-Psコートされたビーズ  
1個を試料若しくは標準物を含むプレートの各ウェルに加えて、全てのビーズが完全に緩衝剤で覆われることを請け合うために穏やかに浸透する。

4. プレートをRIAキットで供給された粘着性の裏張で覆い、6時間室温にてプレートを培養する。

5. プレートをクイックウォッシュ (Qwik Wash) 装置と脱イオン水を用いて洗浄する。

6. マウスanti-18C抗体を希釈液中1:1000に希釈する。

7. この溶液200μlをビーズ一個を含む各ウェル

に加える。

8. プレートを覆い、室温で一晩培養する。

9. プレートをクイックウォッシュ装置と脱イオン水を用いて洗浄する。

10. <sup>125</sup>I-ラベルされたヤギ、アンチマウス抗体を希釈液に15000cpm/10μlまで希釈 (〜1:160希釈) する。

11. この溶液20μlをビーズ一個を含む各ウェルに加える。

10 12. プレートを覆い、37℃で2時間培養する。

13. プレートをクイックウォッシュ装置と脱イオン水を用いて洗浄する。

14. RIAキットで供給されるプラスチックチューブにビーズを移し、好適なガンマカウンターでカウントする。

【0112】計算

1. 各サンプル、標準、及び培養緩衝コントロールのそれぞれについて平均を得るために複数の測定を共に合わせる。全ての標準及び試料から培養緩衝コントロールを基礎とする。

2. 統計的な計算のために用意された計算機を使用して、標準線のためのデータを入力する。そして相関係数と線の勾配を計算する。

3. 好適な標準線を使用して (自由部分は自由部分に、結合部分は結合部分に)、試料の応答を計算し、希釈のために調製する。

上述した同様の手段は置換型の特定の試薬によって他のPn-Ps種のいかなるものに対しても適当である。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>  
C12R 1:46)

識別記号 庁内整理番号

FI

技術表示箇所

(72)発明者 アービ ハゴビアン  
アメリカ合衆国, 19446 ペンシルヴァニア, ランスデール, ハートレイ ドライヴ 771

(72)発明者 ウィリアム ジェー. ミラー  
アメリカ合衆国, 19454 ペンシルヴァニア, ノース ウェールズ, オールド チャーチ ロード 232

(72)発明者 シヤーロット シー. イブ  
アメリカ合衆国, 19422 ペンシルヴァニア, ブルー ベル, チャドウィック アヴェニュー 1665

(72)発明者 ジョン ビー. ヘネシー, ジュニア  
アメリカ合衆国, 18917 ペンシルヴァニア, ダブリン, フォックス ホロー ロード 114

(72)発明者 デニス ジェー. キュベク  
アメリカ合衆国, 26426 ウェスト ヴァージニア, セイレム, キヤロライナ アヴェニュー 76

(72)発明者 パメラ デー. バーク  
アメリカ合衆国, 19446 ペンシルヴァニア, ランスデール, ヨークタウン ストリート 862

(Immunoglobulin M); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (Streptolysins);  
0 (pneumolysin)

Record Date Created: 19891215

Record Date Completed: 19891215

3/9/16

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

06036914 89051814 PMID: 3191508

**Immunochemical studies on the N-acetyllactosamine beta-(1----6)-linked trisaccharide specificity of Ricinus communis agglutinin.**

Wu A M; Sugii S; Gruezo F G; Kabat E A

Department of Veterinary Pathology, Texas A & M University, College of Veterinary Medicine, College Station 77843.

Carbohydrate research (NETHERLANDS) Jul 15 1988, 178 p243-57, ISSN 0008-6215 Journal Code: 0043535

Contract/Grant No.: CA-13696; CA; NCI

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

The combining site of Ricinus communis agglutinin (RCA1) was studied by quantitative precipitin and precipitin inhibition assays. Of 31 complex carbohydrates tested, all except active and inactive antifreeze glycoproteins, *Streptococcus* group C polysaccharide, and native rat salivary glycoprotein, reacted strongly, and 22 completely precipitated the lectin, indicating that RCA1 has both a broad range of affinity and a low solubility of its carbohydrate-bound complex. Of the monosaccharides and glycosides tested for inhibition of precipitation, p-nitrophenyl beta-D-galactopyranoside was the best. It was about 6.4 times better than methyl beta-D-galactopyranoside. The beta anomer of glycosides of D-galactose was much more potent than the corresponding alpha anomer. Among the oligosaccharides tested, beta-D-Galp-(1----4)-beta-D-GlcpNAc-(1----6)-D-Gal was the best inhibitor, which was approximately 2/3 as active as p-nitrophenyl beta-D-galactopyranoside. It was approximately 1.4 times as active as beta-D-Gal-(1----4)-D-GlcNAc (N-acetyllactosamine), twice as active as beta-D-Gal-(1----3)-D-GlcNAc, and 4.5 times more active than lacto-N-tetraose. From the results, it can be concluded that; (a) hydrophobic interaction is important for binding; (b) the combining site of this lectin is at least as large as a trisaccharide; and (c) of the compounds studied, the trisaccharide beta-D-Galp-(1----4)-beta-D-GlcpNAc-(1----6)-D-Gal was the most complementary to the human blood group I Ma determinant beta-D-Galp-(1----4)-beta-D-GlcpNAc-(1----6)-D-Gal.

Tags: Animal; Female; Human; Support, Non-U.S. Gov't; Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.; Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Descriptors: \*Amino Sugars--metabolism--ME; \*Lectins--metabolism--ME; \*Trisaccharides--metabolism--ME; Cattle; Horses; Immunohistochemistry; Substrate Specificity; Swine

CAS Registry No.: 0 (Amino Sugars); 0 (Lectins); 0 (Trisaccharides); 0 (ricinus lectins); 32181-59-2 (N-acetyllactosamine)

Record Date Created: 19890110

Record Date Completed: 19890110

3/9/17

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05989363 89004017 PMID: 3048861

**Demonstration of cross-reactions between pneumococci and alpha-streptococci using gold-labelled mono- and polyclonal antibodies and electron microscopy.**

Sjogren A M; Holme T; Risling M

Department of Bacteriology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Diagnostic microbiology and infectious disease (UNITED STATES) May 1988

, 10 (1) p7-21, ISSN 0732-8893 Journal Code: 8305899



Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Cross-reactions between alpha- **streptococci** and the pneumococcal C - **polysaccharide** (PnC) were investigated using electron microscopy and immunogold labelling of bacterial cells. Monoclonal antibodies against two different determinants of the PnC molecule were used, one directed against the chain sugar of the repeating unit 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose (Sug) and the other against the phosphorylcholine residue. Two different immunogold techniques were tested, either by direct labelling of the monoclonal antibody or by using an antimouse immunogold conjugate to demonstrate binding of the monoclonal antibodies. Antibodies against the "Sug" determinant reacted only with pneumococci, whereas antibodies against the phosphorylcholine determinant bound to cross-reacting **streptococci** as well as to pneumococci. These results indicate that the cross-reacting antigens of the alpha- **streptococci** contain phosphorylcholine residues, but that they are not identical to the C - **polysaccharide** molecule.

Tags: Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; \* **Streptococcus pyogenes**--immunology--IM; Antibodies; Antibodies, Monoclonal; Cross Reactions; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; Immunoenzyme Techniques; Microscopy, Electron; **Streptococcus pneumoniae**--ultrastructure--UL; **Streptococcus pyogenes**--ultrastructure--UL

CAS Registry No.: 0 (Antibodies); 0 (Antibodies, Monoclonal)

Record Date Created: 19881121

Record Date Completed: 19881121

3/9/18

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05793873 88147440 PMID: 2449797

**Availability of reaction with antibodies of the pneumococcal C - polysaccharide on the surface of capsulated pneumococci.**

Sjogren A; Lindholm B; Holme T

Department of Bacteriology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology (DENMARK) Dec 1987, 95 (6) p371-8, ISSN 0108-0180

Journal Code: 8206623

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Antigen detection for diagnosis of pneumococcal infections has earlier been based on the use of antibodies against capsular antigens. **Methods** based on the demonstration of C - **polysaccharide** (PnC) have the advantage of using antibodies against one single species-specific antigen instead of applying a **polyvalent** mixture of **antisera** against 83 different capsular antigens. Very little has been done earlier to evaluate the accessibility of the PnC on the surface of pneumococcal cells, particularly cells carrying capsules, and the release of PnC to the environment. We have used a monoclonal anti-PnC antibody in an **ELISA** inhibition test to demonstrate PnC during growth from four different **Streptococcus pneumoniae** strains (capsular types 1, 3 and 19F) and a C-mutant strain, reported to carry PnC as a small capsule. Heavily-capsulated types 3 and 19F exposed more PnC on their surface than the type 1 strain, and considerable amounts of PnC were released to the culture medium during growth. The C-mutant strain differed from the other strains in that it exposed less PnC on its surface. The type 1 strain and the C-mutant released approximately the same amount of PnC to the culture medium. Treatment with antibiotics during growth caused a decrease in surface-located PnC but did not significantly affect the amount released. The total accessible PnC in these cultures was quite significant and well above the limit of detection in an **ELISA** earlier described for the detection of PnC in clinical samples. The results presented here give

support to the notion that the demonstration of PnC in clinical samples should provide a good basis for diagnosis of pneumococcal pneumonia.

Descriptors: Antibodies, Bacterial--immunology--IM; \*Antigens, Bacterial--immunology--IM; \*Epitopes--analysis--AN; \*Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; \* **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Polysaccharides, Bacterial--analysis--AN; **Streptococcus pneumoniae**--growth and development--GD

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Epitopes); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19880407

Record Date Completed: 19880407

3/9/19

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05680484 88033650 PMID: 3499450

**Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C polysaccharide and F antigen.**

Sorensen U B; Henrichsen J

World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Pneumococci, Statens Serum Institut, Copenhagen S, Denmark.

Journal of clinical microbiology (UNITED STATES) Oct 1987, 25 (10) p1854-9, ISSN 0095-1137 Journal Code: 7505564

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

By serological **methods**, all 83 known types of **Streptococcus pneumoniae** could be shown to possess **C polysaccharide** and F antigen. Cross-reactions due to these two antigens between pneumococci and a broad range of most other commonly encountered **streptococci** were examined. The presence of an antigen closely similar or identical to pneumococcal **C polysaccharide** was demonstrated in some strains of **Streptococcus mitior**. Therefore, we conclude that pneumococci cannot be identified serologically from mixed samples without culture. **Streptococcal** group C **antiserum** was found to cross-react with pneumococcal F antigen.

Descriptors: Antigens, Bacterial--immunology--IM; \*Antigens, Heterophile--immunology--IM; \*Forssman Antigen--immunology--IM; \*Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; \* **Streptococcus** --immunology--IM; \* **Streptococcus pneumoniae**--immunology--IM; Cross Reactions; Immunoelectrophoresis; Immunoelectrophoresis, Two-Dimensional

CAS Registry No.: 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Antigens, Heterophile); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus)); 9013-60-9 (Forssman Antigen)

Record Date Created: 19871217

Record Date Completed: 19871217

3/9/20

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05630418 87309860 PMID: 3624879

**A highly specific two-site ELISA for pneumococcal C - polysaccharide using monoclonal and affinity - purified polyclonal antibodies.**

Sjogren A M; Holme T

Journal of immunological methods (NETHERLANDS) Aug 24 1987, 102 (1) p93-100, ISSN 0022-1759 Journal Code: 1305440

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

A two-site **ELISA** for the detection of pneumococcal **C - polysaccharide** (PnC) has been developed. A monoclonal antibody directed against the

phosphorylcholine residue of the PnC was used as catcher and an **affinity - purified polyclonal anti-PnC rabbit antiserum** for detection. **Polyclonal** antibodies against the PnC as well as capsular antigens were obtained by immunizing rabbits with type 1 pneumococci. Antibodies against the phosphorylcholine determinant of PnC could be removed by **affinity purification**. Remaining antibodies reacted in an **ELISA** with type 1 capsular polysaccharide as well as with PnC. Only in the fraction with the highest antibody activity against PnC, phosphorylcholine exhibited a slight inhibitory action. It is concluded that the **purified** antibody preparation reacted with an antigenic determinant shared by the two polysaccharides, in all probability a determinant associated with 2-acetamido-4-amino-2,4,6-tri deoxygalactose which is the only monosaccharide component in common between PnC and the type 1 capsular polysaccharide. By the use of this **affinity - purified** antibody preparation, reactions with alpha- **streptococci**, occurring with non- **purified** serum, were abolished. The sensitivity and specificity of the test was determined using capsulated and non-capsulated pneumococci and alpha- **streptococci** known to cross-react with unpurified serum against the pneumococcal **C - polysaccharide**.

Tags: Animal

Descriptors: \*Antibodies, Bacterial--immunology--IM; \*Antibodies, Monoclonal--immunology--IM; \*Antigens, Bacterial--analysis--AN; \*Polysaccharides, Bacterial--analysis--AN; Antibodies, Bacterial--isolation and **purification** --IP; Chromatography, **Affinity**; Cross Reactions; Enzyme-Linked Immunosorbent **Assay**; Rabbits

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Antibodies, Monoclonal); 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19871005

Record Date Completed: 19871005

3/9/21

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05509825 87188750 PMID: 3568596

**Etiologic diagnosis of pneumonia by antigen detection: crossreactions between pneumococcal C - polysaccharide and oral microorganisms.**

Sjogren A M; Holmberg H; Krook A

Diagnostic microbiology and infectious disease (UNITED STATES) Mar 1987

, 6 (3) p239-48, ISSN 0732-8893 Journal Code: 8305899

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Crossreactions between bacteria occurring more or less frequently in the respiratory tract were investigated using an enzyme-linked immunosorbent **assay** ( **ELISA** ) developed for the detection of pneumococcal **C - polysaccharide**. A collection of 218 strains was investigated: 30 **Streptococcus pneumoniae**, 120 alpha- **streptococci**, and 68 strains representing other species. Strong crossreactions were observed with 36% of the alpha- **streptococci** and with two of 11 *Staphylococcus aureus* strains. The collection of alpha- **streptococci** consisted of 90 fresh clinical isolates and 30 stock strains. Almost all crossreactions of alpha- **streptococci** were found among the clinical isolates. Among the stock strains only one of four **Streptococcus mitis** strains was positive. Pneumococcal **C - polysaccharide** and phosphorylcholine inhibited the reactions in **ELISA** with monoclonal antibodies against pneumococcal **C - polysaccharide**, as well as with a **polyclonal antiserum** against pneumococcal **C - polysaccharide**. We suggest that the cross reactions between alpha- **streptococci** and pneumococci depend on the presence of phosphorylcholine as a common antigenic determinant. The crossreaction in the **ELISA** with some *Staphylococcus aureus* strains may be explained by the presence of protein A binding to the Fc portion of the antibodies. When the 10 alpha- **streptococci** that showed the strongest crossreactions and ten pneumococci representing different types were tested in different concentrations the absorbance values were lower for most alpha- **streptococci** compared with the pneumococci. This explains that false

concentrations in all individuals. The discrepancy in the Ig class of the antibody SC is probably related to the difference in the pre-vaccination immunity against PPS and CPS.

Tags: Human; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: \*Antibodies, Bacterial--biosynthesis--BI; \*B-Lymphocytes--physiology--PH; \*Bacterial Vaccines--immunology--IM; \*Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; Adult; B-Lymphocytes--immunology--IM; Immunoglobulin A--biosynthesis--BI; Immunoglobulin G--biosynthesis--BI; Immunoglobulin M--biosynthesis--BI; Plaque Assay; Pneumococcal Vaccines; Vaccination

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Bacterial Vaccines); 0 (Immunoglobulin A); 0 (Immunoglobulin G); 0 (Immunoglobulin M); 0 (Pneumococcal Vaccines); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (pneumococcal polysaccharide, type III); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19870317

Record Date Completed: 19870317

3/9/24

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

05299302 86300679 PMID: 3743553

**Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with coagglutination and latex agglutination for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia by detecting antigen in sputa.**

Holmberg H; Krook A

European journal of clinical microbiology (GERMANY, WEST) Jun 1986, 5 (3) p282-6, ISSN 0722-2211 Journal Code: 8219582

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay detecting the species-specific pneumococcal C polysaccharide was compared to latex agglutination and a coagglutination test which detected capsular pneumococcal antigens in sputum specimens with regard to specificity and sensitivity. Specimens from 52 patients with clinical and radiological evidence for pneumonia were tested. Twenty-one patients with *Streptococcus pneumoniae* isolated in sputum and 31 patients with a non-pneumococcal etiology were included. The predictive values for a positive test by enzyme-linked immunosorbent assay was 0.91 and for a negative test 0.97, by latex agglutination 0.90 and 0.91, and by coagglutination 0.84 and 0.85 respectively; these values did not show a statistically significant difference. Whereas agglutination tests are technically more simple and can be performed more rapidly, the enzyme-linked immunosorbent assay has the advantage of detecting pneumococcal C polysaccharide, an antigen common to all pneumococci. Thus it provides an interesting alternative to tests based on serum containing antibodies to all 83 different capsular polysaccharides.

Tags: Comparative Study; Female; Human; Male; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: Antigens, Bacterial--analysis--AN; \*Pneumonia, Pneumococcal--diagnosis--DI; \*Polysaccharides, Bacterial--analysis--AN; \*Sputum--microbiology--MI; \**Streptococcus pneumoniae*--isolation and purification--IP; Adolescent; Adult; Aged; Agglutination Tests; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Latex Fixation Tests; Middle Age; Sputum--immunology--IM; *Streptococcus pneumoniae*--immunology--IM

CAS Registry No.: 0 (Antigens, Bacterial); 0 (Polysaccharides, Bacterial); 0 (polysaccharide C-substance (Streptococcus))

Record Date Created: 19861009

Record Date Completed: 19861009

3/9/25

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

3/9/9

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

08337673 95025643 PMID: 7939415

**Differences within mono- and dizygotic twin-pairs in spectrotypes and clones of IgG2 antibodies to pneumococcal polysaccharide type 1 and C - polysaccharide after vaccination.**

Konradsen H B; Hahn-Zoric M; Nagao A T; Hanson L A

Department of Bacteriology, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark.

Scandinavian journal of immunology (ENGLAND) Oct 1994, 40 (4) p423-8

, ISSN 0300-9475 Journal Code: 0323767

Document type: Journal Article; Twin Study

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS

Spectrotypes and clones of antibodies against pneumococcal capsular polysaccharide (Ps) type 1 and C - polysaccharide (C -Ps) were determined before and after immunization with a polyvalent pneumococcal Ps vaccine in 84 mono- or dizygotic twins. The method used was a micromodification of a rapid isoelectric focusing- affinity (IEF- affinity) immunoblot technique in agarose permitting characterization of isotype, light chain and Gm type. After vaccination the anti-type 1 Ps + anti-C-Ps clones were different in 75% of the monozygotic and 79% of the dizygotic twins. The anti-type 1 Ps clones differed among 72% of the monozygotic and 85% of the dizygotic twins ( $P > 0.05$ ). Each twin had from zero to three clones producing IgG2 antibodies against type 1 Ps. A total of six different clones could be distinguished among all the twins. Vaccination enhanced the already actively secreting B-cell clones in 56 twins and newly recruited clones in 11 of the 84 twins; six among the 48 mono- and five among the 36 dizygotic twins. These new clones differed among the twins. Spectrotypes varied between all twins within the pairs. The fact that all twins differed in spectrotype is due to post-translational microheterogeneity of the antibodies, events which are thus not genetically determined. The observation that even monozygotic twins possessed and responded with different clones within the pairs indicates that the V-region genes, which determine the final specificity of B cells, either differ from the original germ-line V region genes, e.g. owing to hypermutations or junctional diversity, or the rearranged germ-line genes occur accidentally although highly restricted.

Tags: Comparative Study; Female; Human; Male; Support, Non-U.S. Gov't

Descriptors: Antibodies, Bacterial--genetics--GE; \*Bacterial Vaccines--immunology--IM; \*Immunoglobulin G--genetics--GE; \*Polysaccharides, Bacterial--immunology--IM; \*Streptococcus pneumoniae--immunology--IM; \*Twins, Dizygotic; \*Twins, Monozygotic; Adult; B-Lymphocytes--immunology--IM; Clone Cells; Immunoblotting; Isoelectric Focusing

CAS Registry No.: 0 (Antibodies, Bacterial); 0 (Bacterial Vaccines);

0 (Immunoglobulin G); 0 (Polysaccharides, Bacterial)

Record Date Created: 19941024

Record Date Completed: 19941024

3/9/10

DIALOG(R) File 155:MEDLINE(R)

(c) format only 2003 The Dialog Corp. All rts. reserv.

08261743 94327765 PMID: 7914205

**Detection of Streptococcus pneumoniae in sputum samples by PCR.**

Gillespie S H; Ullman C; Smith M D; Emery V

Division of Communicable Diseases, Royal Free Hospital School of Medicine, London, United Kingdom.

Journal of clinical microbiology (UNITED STATES) May 1994, 32 (5) p1308-11, ISSN 0095-1137 Journal Code: 7505564

Document type: Journal Article

Languages: ENGLISH

Main Citation Owner: NLM

Record type: Completed

Subfile: INDEX MEDICUS